

**Kernlokalisierung der viralen Proteine IE2 und PE38
während der Baculovirusinfektion**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von
Daniela Murges
aus Ormont

2000

Berichterstatter: Prof. Dr. Dagmar Knebel-Mörsdorf
Prof. Dr. Walter Doerfler

Tag der Disputation: 12. Dezember 2000

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
1.	Das Baculovirussystem.....	1
1.1	Baculovirus-Wirtszell Interaktionen.....	1
1.2	Kommerzielle Anwendungsgebiete der Baculoviren	2
2.	<i>Autographa californica</i> Kernpolyedervirus (AcMNPV), ein Virus der Familie Baculoviridae	3
2.1	Infektionszyklus des Baculovirus AcMNPV <i>in vivo</i>	4
2.2	Infektionszyklus des Baculovirus AcMNPV <i>in vitro</i>	5
3.	Frühe virale Genexpression	7
4.	Potentielle Funktionen der frühen Genprodukte IE2 und PE38	8
5.	Funktionelle Domänen des Zellkerns	10
5.1	PML onkogene Domänen	11
5.2	Assoziation viraler Genprodukte mit PODs	12
6.	Zielsetzung und Vorgehensweise der Arbeit	14
II.	Material	15
1.	Chemikalien	15
2.	Puffer, Lösungen, Medien	16
3.	Enzyme	20
4.	Plasmide und Primer	21
4.1	Plasmide.....	21
4.2	Primer.....	21
5.	Zelllinien, Bakterienstämme und Viren.....	22
5.1	Zelllinien	22
5.2	Bakterienstämme	22
5.3	Viren	22
6.	Antiseren, Antikörper und Proteinstandards.....	23
6.1	Primäre Antikörper	23
6.2	Sekundäre Antikörper	24
6.3	Proteinstandards.....	24
7.	Geräte und sonstiges Material.....	24

III. Methoden	27
1. Zellkulturen.....	27
1.1 Kultivierung der Insektenzelllinien TN-368 und IPLB-Sf21	27
1.2 Kultivierung der Säugerzelllinie BHK21.....	27
1.3 Kultivierung der Säugerzelllinie HeLa	27
1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	27
1.5 Bestimmung der Zellzahl.....	27
1.6 Testen der Zellkultur auf Mykoplasmen.....	27
1.7 Markierung der Insektenzelllinie TN-368 mit BrdU	28
2. Arbeiten mit AcMNPV	28
2.1 Herstellung von Virusinokulum.....	28
2.2 Bestimmung der Infektiosität des Inokulums, Plaque-Test	28
2.3 Infektion von TN-368 Zellen.....	28
2.4 Herstellung von Virusrekombinanten.....	29
2.4.1 Herstellung des rekombinanten Virus AcMNPV-PML/1.....	29
2.4.2 Herstellung des rekombinanten Virus AcMNPV-PML/e	32
3. Arbeiten mit DNA	34
3.1 Präparation von Plasmid DNA	34
3.1.1 Schnellpräparation von Plasmid DNA (LiCl-Methode).....	34
3.1.2 Präparation von Plasmid DNA (CsCl-Methode).....	34
3.1.3 Präparation von Plasmid DNA (Midi-Präparation, Qiagen)	34
3.2 Präparation von AcMNPV DNA aus infizierten Sf21 Zellen (CsCl- Methode).....	34
3.3 Schnellpräparation viraler DNA aus extrazellulären Viren	34
3.4 Ethanolfällung von DNA.....	34
3.5 Phenol/Chloroform Extraktion	35
3.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA.....	35
3.7 Klonierung von DNA Fragmenten	35
3.7.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	35
3.7.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA Fragmenten.....	35
3.7.3 Elution von DNA Fragmenten aus Agarosegelen	35
3.7.4 Synthese und Reinigung von Oligodesoxyribonukleotiden	35
3.7.5 Kinasierung und Dephosphorylierung von DNA Fragmenten	35
3.7.6 Modifizierung von 3'-Überhängen durch T4 DNA Polymerase	35

3.7.7	Modifizierung von 5'-Überhängen durch Klenow Enzym.....	35
3.7.8	Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation kleiner DNA Fragmente	36
3.7.9	Ligasierung von DNA Fragmenten	36
3.7.10	Herstellung hitzeschockkompetenter Zellen	36
3.7.11	Transformation hitzeschockkompetenter Zellen mit Plasmid DNA ..	37
3.8	Sequenzierung von Plasmid DNA	37
3.9	Klonierung der Plasmide pBS-pe38PML und pBS-pe38PML-HR1	37
3.10	Klonierung der Transfervektoren pUC-PE38PML und pUC-ME53LacZ/PE38PML	38
3.11	Klonierung der Expressionsvektoren pCMV-IE2 und pCMV-PE38	40
4.	Arbeiten mit Proteinen.....	41
4.1	Präparation von Proteinextrakten aus Zellkulturen.....	41
4.1.1	Präparation von fraktionierten, detergentenbehandelten Proteinextrakten.....	41
4.1.2	Präparation von Kernextrakten zur Immunpräzipitation	41
4.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford-Test).....	42
4.3	Überexpression und Reinigung von rekombinantem IE2 und PE38 aus Bakterien zur Herstellung polyklonaler anti-IE2 und anti-PE38 Mäusseren..	42
4.4	Kopplung von IE2 und PE38 Antiseren an Sepharose	44
4.5	Immunpräzipitation.....	45
4.6	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS- Polyacrylamidgelen	46
4.7	Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulosemembranen mit immunchemischem Nachweis der Proteine durch Antikörper (Westernblot).....	46
5.	Transfektion eukaryontischer Zellen	48
5.1	Transfektion der Insektenzelllinie TN-368.....	48
5.2	Transfektion der Säugerzelllinien HeLa und BHK21	48
6.	Indirekte Immunfluoreszenz	49
6.1	Zellpräparation.....	50
6.2	Fixierung der Zellen.....	50
6.2.1	Fixierung durch Präzipitation (Aceton-Fixierung)	50
6.2.2	Fixierung durch Vernetzung (Paraformaldehyd-Fixierung).....	51

6.3	Denaturierung der DNA nach Markierung mit BrdU	51
6.4	Antikörperbindung	51
6.5	Doppelfärbungen	52
6.6	Fluoreszenzmikroskopie	53
IV.	Ergebnisse	55
1.	Kernlokalisierung von IE2 und PE38 im Infektionsverlauf	55
2.	Kolokalisierung von IE2 und PE38 in Kerndomänen 2 h p.i.	57
3.	Expression und Lokalisierung des humanen PML Proteins in Insektenzellen	59
3.1	Herstellung rekombinanter Baculoviren zur Expression von PML in Insektenzellen	61
3.1.1	Herstellung von AcMNPV-PML/1	61
3.1.2	Herstellung von AcMNPV-PML/e	63
3.2	Analyse der PML Expression nach Infektion mit AcMNPV-PML/1 und nach Infektion mit AcMNPV-PML/e	63
4.	Lokalisierung von PML im Infektionsverlauf	66
5.	Kolokalisierung von IE2 und PML im Infektionsverlauf	68
6.	Assoziation von IE2 und PE38 mit PODs aus Säugerzellen	70
6.1	Expression von IE2 und PE38 in BHK21 Zellen	70
6.2	Potentielle Kolokalisierung von PML mit IE2 und PE38 in BHK21 Zellen ..	72
7.	Potentielle Kolokalisierung von IE2/PML, PE38/PML und IE2/PE38 in transfizierten TN-368 Zellen	74
8.	Assoziation der IE2 Domänen mit Faktoren der viralen Replikation	78
8.1	Assoziation von IE2 und LEF-3 in der frühen Phase der Infektion	78
8.2	Assoziation von IE2 und DBP in der frühen Phase der Infektion	81
9.	Immunpräzipitation der IE2 Domäne im Infektionsverlauf	81
9.1	Koimmunpräzipitation von PE38 und DBP als Komponente der IE2 Domäne im Infektionsverlauf	82
9.2	Kontrollexperimente zur IE2 Immunpräzipitation	84
9.2.1	Allgemeine Kontrollen	84
9.2.2	Kontrolle der DBP bzw. PE38 Kopräzipitation in der späten und sehr späten Phase der Infektion	86
10.	Untersuchung zur Kopräzipitation von PML und IE2	90
11.	Assoziation von IE2 mit funktionellen Kerndomänen im Infektionsverlauf	92

11.1	Markierung viraler Replikationszentren mit BrdU	92
11.2	Kolokalisierung von IE2 mit Orten viraler Replikation im Infektionsverlauf	94
11.3	Kolokalisierung von DBP mit viralen Replikationszentren.....	96
12.	Lokalisierung von PML in Relation zu frühen viralen Replikationszentren	96
13.	Untersuchungen zur Interaktion von PML und endogenem SUMO der Insektenzelle	99
13.1	Kolokalisierung von PML und SUMO nach Transfektion und im Infektionsverlauf	99
13.2	Potentielle kovalente Modifizierung von PML im Infektionsverlauf.....	101
V.	Diskussion.....	105
1.	Virusinduzierte Replikationszentren.....	105
2.	IE2 Assoziation mit frühen viralen Replikationszentren	106
3.	PML, Marker potentieller insektenzellspezifischer PODs	108
3.1	Verspätete PML Expression im Infektionsverlauf.....	108
3.2	Interaktion von PML mit SUMOylierungsmechanismen der Insektenzelle.	109
4.	IE2 und PML Umstrukturierung während der Baculovirusinfektion	111
5.	IE2 und PE38: Partner während der Baculovirusinfektion.....	113
6.	Potentielle Organisation der IE2 Domänen in der frühen Phase der Infektion	115
7.	Ausblick	118
7.1	Identifizierung POD homologer Strukturen der Insektenzelle	118
7.2	Untersuchung zur Interaktion von IE2 mit Assoziationspartnern	119
7.3	Markieren IE2 Domänen präexistierende virale Replikationsorte der Insektenzelle?.....	119
VI.	Zusammenfassung	121
VII.	Literaturverzeichnis	123
VIII.	Kurzzusammenfassung	135
IX.	Abstract	136
X.	Erklärung	137
XI.	Lebenslauf	138
XII.	Danksagung.....	139

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung der klonierten Sequenzen der ie2 und pe38 Genregion	40
Abb. 2:	Analyse der IE2 und PE38 Lokalisierung im Infektionsverlauf (Quadt, 2000)	56
Abb. 3:	Kolokalisierung von IE2 und PE38 2 h p.i.	58
Abb. 4:	Lokalisierung von heterolog exprimiertem PML in TN-368 Zellen und endogenem PML in BHK21 Zellen	60
Abb. 5:	Schematische Darstellung der Rekombination zur Herstellung von AcMNPV-PML/l	62
Abb. 6:	Schematische Darstellung der Rekombination zur Herstellung von AcMNPV-PML/e	62
Abb. 7:	Analyse der PML Expression in AcMNPV-PML/l infizierten TN-368 Zellen	65
Abb. 8:	Analyse der PML Expression in AcMNPV-PML/e infizierten TN-368 Zellen	65
Abb. 9:	Analyse der PML Lokalisierung im Infektionsverlauf	67
Abb. 10:	Kolokalisierung von IE2 und PML im Infektionsverlauf	69
Abb. 11:	Analyse der IE2 und PE38 Lokalisierung nach Transfektion der Säugerzelllinie BHK21	71
Abb. 12:	Potentielle Kolokalisierung von IE2/PML, PE38/PML und IE2/PE38 nach Transfektion der Säugerzelllinie BHK21	73
Abb. 13:	Potentielle Kolokalisierung von IE2/PML und PE38/PML nach Transfektion der Insektenzelllinie TN-368	75
Abb. 14:	Potentielle Kolokalisierung von IE2 und PE38 nach Transfektion der Insektenzelllinie TN-368	77
Abb. 15:	Assoziation von IE2 und LEF-3 in der frühen Phase der Infektion	79
Abb. 16:	Assoziation von IE2 und DBP in der frühen Phase der Infektion	80
Abb. 17:	Immunpräzipitation des IE2 Komplexes unter Kopräzipitation von PE38 und DBP im Infektionsverlauf	83
Abb. 18:	Allgemeine Kontrollexperimente zur IE2 Immunpräzipitation	85
Abb. 19:	Kontrollexperimente zur DBP bzw. PE38 Kopräzipitation in der späten Phase und sehr späten Phase der Infektion	87
Abb. 20:	PE38 Immunpräzipitation im Infektionsverlauf	89
Abb. 21:	Untersuchung zur Kopräzipitation von PML und IE2	91
Abb. 22:	Analyse der BrdU Markierung infizierter und uninfizierter TN-368 Zellen	93

Abb. 23: Kolokalisierung von IE2 mit BrdU markierten Replikationszentren	95
Abb. 24: Kolokalisierung von DBP mit BrdU markierten Replikationszentren	97
Abb. 25: Analyse der PML Lokalisierung in Relation zu frühen BrdU markierten Replikationszentren.	98
Abb. 26: Lokalisierung des endogenen Proteins SUMO nach Transfektion der Zelllinie TN-368	100
Abb. 27: Kolokalisierung von PML und SUMO nach Transfektion der Zelllinie TN-368 und im Infektionsverlauf	102
Abb. 28: Potentielle kovalente Modifizierung von PML im Infektionsverlauf.....	103
Abb. 29: Lokalisierung von PML/BrdU, IE2/BrdU und PML/IE2 6 h p.i.	117

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AcMNPV	<i>Autographa californica</i> Kernpolyerdervirus
Ad	Adenovirus
BHK21	Säugerzelllinie (<u>B</u> aby <u>H</u> amster <u>K</u> idney 21)
BmNPV	<i>Bombyx mori</i> Kernpolyedervirus
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumine)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	<u>c</u> opy- <u>D</u> NA
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CMV	<u>C</u> ytomegalovirus
ddNTP	Didesoxyribonukleotid-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<u>d</u> eoxyribonucleic <u>a</u> cid)
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
et al.	und andere
E. coli	Bakterium <i>Escherichia coli</i>
EtOH	Ethanol
g	Gramm
G	Guanin
HeLa	Säugerzelllinie HeLa
h p.i.	Stunden nach Infektion (<u>h</u> ours post <u>i</u> nfection)
hr	homologe Region (<u>h</u> omologous <u>r</u> egion)
HSV	<u>H</u> erpes <u>s</u> implex <u>V</u> irus
IP	<u>I</u> mmunpräzipitation
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

l	Liter
M	Mol
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
M.O.I.	Infektionsmultiplizität (<u>m</u> ultiplicity <u>o</u> f <u>i</u> nfection)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
nm	Nanometer
OD	<u>o</u> ptische <u>D</u> ichte
ORF	offenes Leseraster (<u>o</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
RNA	Ribonukleinsäure (<u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid)
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
s.	siehe
sek	Sekunde
sog.	sogenannten
Sf21	Insektenzelllinie <i>Spodoptera frugiperda</i> , Sf21
SV40	Affenvirus <u>S</u> imian <u>V</u> irus <u>40</u>
T	Thymin
TN-368	Insektenzelllinie <i>Trichoplusia ni</i>
WB	<u>W</u> estern <u>b</u> lot
wt	<u>W</u> ild <u>t</u> yp
x g	fache Erdbeschleunigung (g)
z. B.	zum Beispiel

I. Einleitung

1. Das Baculovirussystem

1.1 Baculovirus-Wirtszell Interaktionen

Viren sind kleine infektiöse Partikel, die im Gegensatz zu Zellen keinen eigenen Stoffwechsel besitzen. Daher können sie nur in Abhängigkeit von ihrer Wirtszelle neue Virusgenerationen erzeugen. Im Lauf der Evolution haben Viren besondere Strategien entwickelt, gezielt zelluläre Prozesse zu manipulieren und für die eigenen Biosynthesewege zu nutzen. Die Erforschung der Interaktion zwischen Virus und Wirtszelle liefert daher neben neuen Erkenntnissen über virale Strategien zur effizienten Nutzung zellulärer Prozesse auch Erkenntnisse über Mechanismen der Wirtszelle an sich. Beispielsweise wurde anhand der Adenovirus 2 (Ad2) Infektion der Spleißmechanismus der RNA entdeckt (Bergert et al., 1977; Chow et al., 1977; Berk und Sharp, 1978) oder mit Hilfe des Affenvirus Typ 40 (SV40) sowohl die Struktur als auch die Funktion von cis-regulatorischen Verstärkerelementen (enhancer) beschrieben (Banerji et al., 1981; Moreau et al., 1981). Daneben wurde durch die Untersuchung des großen T Antigens von SV40 zum ersten Mal eine Proteinsequenz entdeckt, die als Signal zum Import von Proteinen in den Zellkern dient (Kalderon et al., 1984; Goldfarb et al., 1986; Lanford et al., 1986).

Wie alle Viren greifen auch insektenpathogene Baculoviren in wichtige zelluläre Prozesse ein. Das Baculovirussystem bietet im Vergleich zu anderen Virussystemen besondere Möglichkeiten zur Beobachtung von Virus-Wirtszell Interaktionen. Neben der *in vitro* Betrachtung der Infektion im Zellkultursystem steht ein *in vivo* Modell des biologischen Wirts, der Insektenlarve, zur Verfügung. Einige Virus-Wirtszell Interaktionen der Baculovirusinfektion sind bereits bekannt:

Im Lichtmikroskop spiegeln sich die Effekte der Baculovirusinfektion auf die Organisation der Wirtszelle in einem charakteristischen zytopathischen Effekt wider. Im Infektionsverlauf kugelt sich die Wirtszelle ab, die Zellkerne schwellen an, alle Nucleoli werden aufgelöst und im Kern bildet sich das virogene Stroma (Xeros, 1956; Volkman und Keddie, 1990). Für einige Ereignisse des zytopathischen Effektes könnte die Umorganisation des Zytoskeletts der

Wirtszelle verantwortlich sein, die innerhalb der ersten Stunden der Infektion beginnt (Charlton und Volkman, 1991). Auf viraler Seite wird dazu das Protein Arif-1 (actin rearrangement inducing factor 1), das für ein bestimmtes Stadium der Actinumstrukturierung verantwortlich ist, exprimiert (Roncarati und Knebel-Mörsdorf, 1997). Neben Effekten der Infektion auf strukturelle Komponenten der Wirtszelle beeinflusst das Virus auch metabolische Prozesse der Zelle wie die RNA Synthese und die Proteinbiosynthese (Ooi und Miller, 1988; Carstens et al., 1979). Die Untersuchung der Transkription von drei Wirtsgenen, die für Actin, ein Histon und das Hitzeschockprotein 70 (hsp70) kodieren, zeigte in der späten Phase der Infektion reduzierte RNA Mengen dieser Gene. Eine besondere Rolle spielen Baculoviren in der Apoptoseforschung. Sie wurden als eine der ersten Virusfamilien identifiziert, die wirtsinduzierte Apoptose aktiv mit viruskodierten Inhibitoren regulieren (Miller et al., 1998). Nach der Charakterisierung der baculoviralen Proteine P35 und mehreren IAP (inhibitor of apoptosis) Proteinen als speziesabhängige Apoptoseinhibitoren konnten homologe Inhibitoren in anderen Organismen gefunden werden (Clem, 1997). Anschließend wurden zelluläre Interaktionspartner des P35 Proteins im Insektensystem und in heterologen Systemen charakterisiert (Miller et al., 1998; Clem, 1997).

Das Baculovirussystem stellt damit ein Modellsystem zur Verfügung, das molekulare Mechanismen der Virusinfektion auf viraler und zellulärer Ebene beleuchtet und gleichzeitig Aussagen über die biologischen Effekte dieser Mechanismen im Wirt erlaubt.

1.2 Kommerzielle Anwendungsgebiete der Baculoviren

Neben der Nutzung als molekularbiologisches Modellsystem werden Baculoviren auf kommerzieller Ebene angewendet.

Der dramatische Effekt der Baculovirusinfektion (Abschnitt 2.1) auf den Wirtsorganismus macht Baculoviren zum Beispiel für die Verwendung als biologische Schädlingsbekämpfungsmittel im Pflanzenschutz interessant. Dabei spielt neben der Virulenz die hohe Wirtsspezifität der Baculoviren eine entscheidende Rolle. Baculoviren replizieren nicht in Vertebraten, sondern infizieren ausschließlich Arthropoden, davon vor allem Insekten der Ordnung Lepidoptera (Blissard, 1996; Black et al., 1997). Die Möglichkeit der genetischen Veränderung von Baculoviren öffnete den Weg für die Insertion insektenspezifischer Toxine in das Virusgenom. Die Virulenz dieser rekombinanten Viren ist gegenüber Wildtypstämmen erhöht, so daß Baculoviren in Konkurrenz mit chemischen

Mitteln der Schädlingsbekämpfung treten können (Stewart et al., 1991; Black et al., 1997). Darüber hinaus werden Baculoviren heutzutage in vielen Labors als eukaryontisches Vektorsystem zur Überexpression von Proteinen verwendet. Gegenüber anderen Expressionssystemen haben Baculoviren den Vorteil, daß sie große Mengen fremder DNA stabil in ihr Genom integrieren. Zur Überexpression der Fremdgene werden meist die Promotoren der baculoviralen Gene p10 und polyhedrin verwendet. Sie gehören zu den hyperexprimierten Genen der sehr späten Phase der Infektion und sind für die Infektion in Zellkultur nicht essentiell. Während der Infektion werden die Fremdproteine mit posttranslationalen Modifikationen versehen, die denen der Vertebraten sehr ähnlich sind. Dadurch können biologisch aktive eukaryontische Proteine produziert werden, die sowohl in der Forschung als auch in der Medizin, zum Beispiel als Impfstoffe oder Pharmaka oder in der Diagnostik, Verwendung finden (King und Posse, 1992; O'Reilly et al., 1992).

Im Zusammenhang mit ihrer Fähigkeit, therapeutisch aktive Fremdproteine zu exprimieren, gibt es Bestrebungen, Baculoviren in der Gentherapie einzusetzen. Ihr entscheidender Vorteil gegenüber humanpathogenen Virussystemen ist, daß sie in Vertebraten nicht replizieren, ihre DNA aber in den Zellkern transferieren (Hofmann et al., 1995; Boyce und Bucher, 1996). Die heutigen baculoviralen Vektoren werden allerdings durch das Komplementsystem des Säugerserums stark inhibiert (Hofmann und Strauss, 1998).

Diese kommerziellen Anwendungsgebiete der Baculoviren stellen einen hohen Anspruch an die Sicherheit dieses Systems. Die Untersuchung der Baculoviren auf molekularer Ebene ist daher von großem Interesse und steht in direktem Zusammenhang mit der Erforschung der Virus-Wirtszell Interaktion.

2. *Autographa californica* Kernpolyedervirus (AcMNPV), ein Virus der Familie Baculoviridae

Das Kernpolyedervirus *Autographa californica* ist auf molekularbiologischer Ebene das am besten beschriebene Baculovirus und wurde ursprünglich aus Insektenlarven des Nachtfalters *Autographa californica* isoliert. Es trägt ein doppelsträngiges, zirkuläres DNA Genom von 133894 bp (Ayres et al., 1994), das durch ein stäbchenförmiges, membranumhülltes Nukleokapsid geschützt wird. Im Infektionszyklus treten als Besonderheit der Baculoviren zwei verschiedene Virusformen auf, der Einschlußkörper (Occluded Virus, OV) und das

extrazelluläre Virus (Budded Virus, BV), die einheitliche Nukleokapside und genetische Information enthalten (Blissard, 1996; Rohrmann, 1992). Der Einschlußkörper garantiert die Existenz des Virus außerhalb der Larve und ist für die horizontale Übertragung der Virusinfektion von Larve zu Larve verantwortlich. Demgegenüber hat das extrazelluläre Virus die systemische Ausbreitung der Infektion im Wirt zur Aufgabe. Daher werden die extrazellulären Viren als infektiöse Viruspartikel in der Zellkultur verwendet und beispielsweise zu Infektionsanalysen in den gängigen Insektenzelllinien *Spodoptera frugiperda* (*S. frugiperda*) oder TN-368 aus der Spezies *Trichoplusia ni* (*T. ni*) genutzt.

Der AcMNPV Infektionszyklus wurde sowohl in Zellkultur als auch im biologischen Wirt, der Insektenlarve, untersucht. Dabei wurden die meisten zellulären und molekularen Aspekte der AcMNPV Infektion zusammen mit den einzelnen Infektionsphasen in Zellkulturstudien (*in vitro*) identifiziert, während die Pathogenese der AcMNPV Infektion in Larvenstudien (*in vivo*) charakterisiert wurde.

2.1 Infektionszyklus des Baculovirus AcMNPV *in vivo*

Der Infektionszyklus in der Insektenlarve beginnt mit der Aufnahme von Einschlußkörpern über die Nahrung. Anschließend gelangen die Einschlußkörper, die eine Vielzahl membranumhüllter Nukleokapside in einer viruskodierte Polyhedrinmatrix enthalten, in den Mitteldarm der Larve und werden im dort vorherrschenden alkalischen Milieu (pH 8-11) aufgelöst (Federici, 1997). Dadurch werden die membranumhüllten Nukleokapside aus der Polyhedrinmatrix in das Darmlumen freigesetzt und lösen die Primärinfektion des Darmepithels der Insektenlarve aus. Die freigesetzten membranumhüllten Nukleokapside durchbrechen die peritrophische Membran des Darms, die morphologisch über den Darmepithelzellen liegt und fusionieren mit der Mikrovillimembran der Darmepithelzellen (Federici, 1997). Innerhalb von 8 Stunden nach der Aufnahme der Einschlußkörper bildet sich das virogene Stroma im Zentrum der Epithelzellkerne aus und der Zusammenbau neuer Nukleokapside beginnt (Federici, 1997). Diese Nukleokapside verlassen den Mitteldarm der Larve durch die Basallamina der Epithelzellen und initiieren als extrazelluläre Viren die Sekundärinfektion der Larve (Miller, 1996).

Die extrazellulären Viren infizieren zunächst benachbarte Zellen der Basallamina, die dem Tracheen- oder Hämolympsystem der Larve angehören (Keddie et al., 1989; Engelhard et al., 1994; Federici, 1997). Etwa 16 Stunden nach der Aufnahme der Einschlußkörper werden

die ersten extrazellulären Viren in der Hämolymphe der Larve nachgewiesen und 8 Stunden später zeigen die ersten Zellen des Tracheensystems virale Promotoraktivität (Volkman und Keddie, 1990; Federici, 1997; Engelhard et al., 1994). Ab 36 Stunden nach der Aufnahme der Einschlußkörper exprimieren die Hämocyten virale Antigene und 5-24 Stunden später erreicht die virale Infektion die Epidermis und den Fettkörper der Larve (Volkman und Keddie, 1990). Durch die Infektion des offenen Gefäßsystems und des Atmungssystems der Larve breitet sich die Infektion systemisch in fast allen Larvengeweben aus und erreicht dabei sowohl das Nerven- und Muskelgewebe als auch das Fortpflanzungs- und Drüsengewebe der Larve (Federici, 1997).

Durch die Infektion von Geweben außerhalb des Darmepithels beginnt neben der Produktion extrazellulärer Viren der Zusammenbau von Einschlußkörpern in den Zellkernen der infizierten Gewebe. Dabei wird der überwiegende Anteil neuer Einschlußkörper in der Epidermis, im Fettkörper und in den Epithelzellen des Tracheensystems gebildet (Federici, 1997). Im Gegensatz zu diesen Geweben erzeugen die Mitteldarmepithelzellen Polyhedrinkristalle, die nur äußerst selten den Einschluß von Virionen zeigen (Flipsen et al., 1993). Statt dessen wird das infizierte Mitteldarmepithel aufgrund seiner kurzen Regenerationszeit durch ein neues ersetzt (Flipsen et al., 1993).

Während einer typischen AcMNPV Infektion werden pro Larve über eine Billion Einschlußkörper gebildet, die über 10% am Trockengewicht des Insekts ausmachen (Miller, 1996). Etwa 5-6 Tage nach der Aufnahme der Viren stirbt die Larve und die Einschlußkörper werden über Zytolyse in die Umwelt freigesetzt (Volkman und Keddie, 1990; Federici, 1997). Die Einschlußkörper schützen die Virionen vor Umwelteinflüssen bis die nächste Larve sie aufnimmt.

2.2 Infektionszyklus des Baculovirus AcMNPV *in vitro*

Im Gegensatz zur Infektion *in vivo* beginnt der AcMNPV Infektionszyklus in Zellkultur mit der Aufnahme extrazellulärer Viren durch Endozytose. Die Membranhülle der extrazellulären Viren enthält dazu das virale Hüllfusionsprotein GP64, das den Virionen der Einschlußkörper fehlt und eine Funktion bei der Freisetzung der Nukleokapside aus dem Endosom in das Zytoplasma der infizierten Zelle hat (Blissard, 1996). Durch die Verschiebung des pH-Wertes im Endosominneren in den sauren Bereich, fusioniert die Membranhülle des Virus über GP64 Interaktionen mit dem Endosom und die Nukleokapside werden in das Zytoplasma der Zelle entlassen (Blissard und Wenz, 1992; Monsma und Blissard, 1995). Dieser Mechanismus ist

für die Infektion von Zellkulturen essentiell, da GP64 Deletionsmutanten in Zellkultur keine Infektiosität aufweisen (Monsma und Oomens, 1996). Der Transportweg der Nukleokapside zum Zellkern sowie der Mechanismus, der den Eintritt der DNA in das Kernlumen sichert, sind bisher noch nicht aufgeklärt. Möglicherweise spielen dabei Interaktionen der Nukleokapside mit dem Zytoskelett und den Kernporenkomplexen eine Rolle (Miller, 1996; Volkman und Keddie, 1990). Nach der Freisetzung der viralen DNA in das Kernlumen beginnt eine zeitlich koordinierte Kaskade der viralen Genexpression.

In der frühen Phase der viralen Expressionskaskade finden sowohl die Transkription als auch die Proteinbiosynthese der frühen viralen Faktoren statt, die zur Initiation der viralen Replikation benötigt werden. Dabei wird die Transkription der unreplizierten viralen DNA hauptsächlich von der RNA Polymerase der Wirtszelle übernommen (Fuchs et al., 1983).

Die Initiation der viralen Replikation 6-8 Stunden nach der Infektion (h p.i.) stellt den Übergang in die späte Phase der viralen Genexpression dar und zieht die vollständige Replikation des viralen Genoms und den Aufbau des virogenen Stromas mit sich (Williams und Faulkner, 1997). Sie wird in eine späte und sehr späte Phase unterteilt und ist für die Produktion der extrazellulären Viren bzw. der Einschlußkörper verantwortlich. Zur Replikation des viralen Genoms formieren virale Replikationszentren zwischen 4 und 6 h p.i. eine limitierte Anzahl an distinkten Domänen im Kern, die später im Infektionsverlauf an Größe zunehmen (Okano et al., 1999). Sie können mit Hilfe eines Nukleotidanalogs angefärbt werden und assoziieren die viralen Faktoren IE1 (immediate early gene 1), LEF-3 (late expression factor 3) und DBP (DNA binding protein) (Okano et al., 1999). In Plasmidreplikationsexperimenten wurden 5 essentielle und 5 stimulierende viruskodierte Proteine der viralen Replikation identifiziert (Lu et al., 1997). Zum Beispiel gehören die viralen Genprodukte IE1 und LEF-3 zur Gruppe der essentiellen Faktoren, während das anti-apoptotische Genprodukt P35 zur Gruppe der stimulierenden Faktoren gehört. Essentiell für die virale Replikation ist auch die Gegenwart der virusinduzierten Helikase P143, die über direkte Interaktion mit dem Faktor LEF-3 in den Kern transportiert wird (Kool et al., 1994; Lu und Miller, 1995; Wu und Carstens, 1998). Daneben kodiert das Virus eine eigene DNA Polymerase, die sowohl als essentieller als auch als stimulierender Faktor der transienten Plasmidreplikation beschrieben wurde (Lu und Miller, 1995; Kool et al., 1994).

Die späte Genexpression unterliegt einem Regulationsmechanismus, der von der Replikation der viralen DNA abhängt (Rice und Miller, 1986). Es tritt eine virusinduzierte, α -Amanitin resistente RNA Polymerase in Funktion, die die Transkription der späten und sehr späten Gene steuert (Gruha et al., 1981; Fuchs et al., 1983; Blissard, 1996). Diese virusinduzierte

RNA Polymerase ist ein Komplex aus vier viruskodierten Proteinen, der sowohl katalytische als auch Promotorbindungsaktivität besitzt (Guarino et al., 1998). Außerdem ist die Expression der späten Gene von essentiellen viralen Genprodukten, sogenannten späten Expressionsfaktoren (LEF = late expression factor), abhängig (Todd und Passarelli, 1995; Lu und Miller, 1995). Mit der Synthese später Genprodukte, unter anderem der Strukturproteine, beginnt in den Zellkernen der Zusammenbau neuer Nukleokapside, die ab 10 h p.i. den Kern verlassen, um durch Knospung durch die Plasmamembran ihre Membranhülle zu erhalten (Miller, 1996; Blissard, 1996). Diese neuen extrazellulären Viren dringen über GP64 vermittelte Endozytose in die nächste Zelle ein.

Die sehr späte Phase der Infektionskaskade beginnt 18-24 h p.i. und endet mit der Lyse der Wirtszelle (Miller, 1996). Ihre Genexpression wird ebenfalls auf transkriptioneller Ebene kontrolliert und erfordert die Anwesenheit von mindestens einem speziellen Faktor VLF-1 (very late expression factor 1) (McLachlin und Miller, 1994). Die Aufgabe der sehr späten Phase der Infektion ist die Produktion neuer Einschlußkörper. Dazu werden die viralen Gene polyhedrin und p10 hyperexprimiert. Das Genprodukt Polyhedrin stellt die Hauptkomponente der Einschlußkörpermatrix dar (Rohrman, 1986), während P10 eine Funktion bei der Lyse der Wirtszelle hat (Williams et al., 1989; van Oers et al., 1993). Die Nukleokapside der Einschlußkörper werden im Kern von einer möglicherweise *de novo* synthetisierten Membran umhüllt und sofort zu mehreren in die Polyhedrinmatrix eingeschlossen (Stoltz et al., 1973; Blissard, 1996). Die Einschlußkörper akkumulieren im Zellkern der infizierten Zelle und werden anschließend über P10 vermittelte Zelllyse freigesetzt (Federici, 1997).

3. Frühe virale Genexpression

Frühe virale Genprodukte sind die ersten viralen Faktoren, die aktiv nach dem Eintritt des Virusgenoms in der Zelle exprimiert werden und damit kontrolliert in die Wirtszellorganisation eingreifen. Sie bilden den molekularen Schalter, der die Wirtszellmaschinerie in den Dienst des Virus stellt. Per Definition gehören alle viralen Genprodukte, die vor Beginn der viralen Replikation exprimiert werden, zur Gruppe der frühen Gene (Friesen, 1997). Da nackte virale DNA in transfizierten Insektenzellen infektiös ist, ist die Anwesenheit viraler Faktoren, die mit dem Virion in die Zelle eingeschleust werden, für die frühe Genexpression nicht essentiell (Burand et al., 1980; Potter und Miller, 1980). Die Wirtszellmaschinerie beginnt in Zellkultur mit der Produktion spezifischer viraler

Transkripte zwischen 15 und 60 min nach der Zugabe des Virusinokulums (Friesen, 1997). Dabei sind die Bedingungen für die Expression der frühen Gene denkbar ungünstig, da die Konzentration an viraler DNA Matrize im Vergleich zur zellulären DNA verschwindend klein ist. Eine verbreitete Strategie unter im Kern replizierenden Viren zur effizienten Expression ihrer viralen Genome im zellulären Umfeld ist die Expression viraler Transregulatoren. Ihre Expression während des Infektionszyklus sichert, daß die Biosynthesewege der Wirtszelle in den Dienst der Virusproduktion gestellt werden und alle Komponenten, die zur Initiation der viralen Replikation benötigt werden, in ausreichender Menge vorhanden sind (Friesen, 1997). Das bedeutendste regulatorische Protein der frühen baculoviralen Expressionskaskade ist IE1. Zusammen mit seiner Spleißvarianten IE0 stimuliert IE1 über zehn frühe Promotoren in transienten Expressionsstudien (Miller, 1996; Friesen, 1997). Neben IE1 und IE0 wurden zwei weitere baculovirale Transregulatoren, IE2 und PE38, charakterisiert (Carson et al., 1988; Krappa und Knebel-Mörsdorf, 1991; Friesen, 1997). Im Vergleich zu IE1 bzw. IE0 ist die molekulare Rolle dieser beiden Transregulatoren noch weitgehend unbekannt.

4. Potentielle Funktionen der frühen Genprodukte IE2 und PE38

Die baculoviralen Gene *ie2* und *pe38* gehören zu den ersten Genen, die nach Beginn der Infektion exprimiert werden. Sie bilden auf dem *AcMNPV* Genom eine divergente Promotoreinheit mit bidirektionaler Transkription, deren Transkripte 1 h p.i. nachgewiesen werden können (Carson et al., 1988; Krappa und Knebel-Mörsdorf, 1991). Auf Proteinebene wird in *AcMNPV* infizierten Zellen in der frühen Phase der Infektion ein ca. 49 kDa großes IE2 Protein und ein ca. 38 kDa großes PE38 Protein im Zellkern exprimiert (Krappa et al., 1995). Später im Infektionsverlauf nimmt die Expression beider Proteine ab und ein PE38 spezifisches Antiserum erkennt ein kleineres Protein von ca. 20 kDa in der zytoplasmatischen Fraktion der infizierten Zellen. Es wird angenommen, daß es sich dabei um ein stabiles Degradationsprodukt des PE38 Proteins handelt (Krappa et al., 1995).

Die regulatorische Funktion von IE2 und PE38 wurde durch transiente Expressionsstudien entdeckt. Transient exprimiertes IE2 wurde erstmals als Faktor identifiziert, der die Transaktivierung des 39K Promotors durch IE1 erhöhte (Carson et al., 1988). Anschließend wurde es in weiteren Studien auf transkriptionelles Regulationspotential untersucht (Yoo und Guarino, 1994 a, b). Dagegen wirkt sich die regulatorische Funktion des PE38 Proteins stimulierend auf den Promotor des Gens *p143*, das eine Helikase kodiert, aus (Lu und

Carstens, 1993). Als frühe virale Faktoren, die hauptsächlich die Vorbereitung der viralen Replikation zur Aufgabe haben, stimulieren sowohl IE2 als auch PE38 die virale Replikation in Plasmidreplikationsexperimenten. Dieser Effekt steht möglicherweise im Zusammenhang mit ihrer regulatorischen Funktion, da sie für die Plasmidreplikation selbst nicht essentiell sind (Passarelli und Miller, 1993; Lu und Miller, 1995; Kool et al., 1994).

Neben transienten Expressionsstudien liefern Untersuchungen an Baculoviren, die mutante Proteine exprimieren, Informationen über die Funktionen viraler Proteine im Infektionsverlauf. AcMNPV Mutanten, die IE2 defekt exprimieren, zeigen in Zellkultur eine Verzögerung in der Replikation und in der späten Genexpression (Prihod'ko et al., 1999). Dieser Effekt tritt deutlich in *S. frugiperda* Zellen auf, ist aber in Zellen der Spezies *T. ni* kaum zu beobachten. In der Larve verlieren IE2 mutante Viren nach oraler Infektion speziesunabhängig ihre Infektiosität. Dieser Effekt ist allerdings auf fehlende Virusmutanten in den Einschlußkörpern zurückzuführen (Prihod'ko et al., 1999). Dagegen kann die Injektion der IE2 Mutanten in das Hämocoel der Larve eine Infektion auslösen, so daß intakte extrazelluläre Viren auch ohne intaktes IE2 produziert werden. Abgesehen von IE2 defekten Viren des Baculovirus *Autographa californica* wurden auch IE2 Mutanten des homologen Baculovirus *Bombyx mori* beschrieben. BmNPV IE2 Mutanten zeigen ebenfalls eine verspätete virale DNA Replikation, dagegen ist die Wachstumsrate dieser Viren in BmN-4 Zellen nicht beeinflusst (Gomi et al., 1997). Bis heute gibt es keine offensichtlichen Zusammenhänge zwischen den mutanten IE2 Phänotypen und den IE2 Funktionen aus transienten Expressionsstudien (Prihod'ko et al., 1999). Im Gegensatz zu replikationsfähigen IE2 Mutanten wurden bisher keine Viren beschrieben, die defektes PE38 exprimieren.

IE2 und PE38 nehmen nicht nur Einfluß auf die virale Infektion, sondern beeinflussen auch zelluläre Prozesse. Transient exprimiertes IE2 arretiert den Zellzyklus der Wirtszelle in der S-Phase (Prihod'ko und Miller, 1998), während kotransfiziertes PE38 IE1 induzierte Apoptose stimuliert (Prihod'ko und Miller, 1999). Es ist sehr unwahrscheinlich, daß PE38 diesen Effekt durch transkriptionelle Regulation bedingt, da beide Proteine, IE1 und PE38, in den Kotransfektionsexperimenten unter Kontrolle des Hitzeschockpromotors 70 exprimiert wurden. Die Mechanismen, über die PE38 oder IE2 in diese zellulären Prozesse eingreifen, sind bisher unklar.

Die Analyse der Aminosäuresequenzen von IE2 und PE38 ergab, daß beide zur Familie der Zinkfinger Proteine gehören und ein sogenanntes RING (C₃HC₄) Motiv besitzen, das sie mit vielen Proteinen unterschiedlicher Funktionen teilen (Freemont et al., 1991; Lovering et al., 1993; Borden, 2000). Mutationen in diesem RING-Finger Motiv beeinflussen die

Eigenschaften beider Proteine. Die Mutation des PE38 RING-Fingers resultiert in einer erhöhten transienten PE38 Expression, die die IE1 induzierte Apoptose aber nicht signifikant beeinflusst (Prihod'ko und Miller, 1999). Dagegen verliert IE2 nach der Deletion des RING-Fingers die Fähigkeit der Zellzyklusblockade, wahrt aber die transregulatorischen Funktionen in transienten Expressionsstudien (Prihod'ko und Miller, 1998). Zusätzlich zum RING-Finger Motiv besitzen IE2 und PE38 einen Leucin-Reißverschluß, der für die Interaktion mit anderen viralen oder zellulären Faktoren benötigt werden könnte.

Die Untersuchung der subzellulären Lokalisierung von IE2 und PE38 mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenzstudien zeigte in transfizierten *S. frugiperda* Zellen, daß IE2 und PE38 in distinkten Domänen im Zellkern lokalisieren (Krappa et al., 1995). Möglicherweise assoziieren IE2 und PE38 dabei mit zellulären und/oder viralen Strukturen. Ob IE2 und PE38 tatsächlich mit funktionellen Kerndomänen, wie beispielsweise Replikationszentren oder Spleißosomen assoziieren, ist bisher unbekannt.

5. Funktionelle Domänen des Zellkerns

Der Zellkern ist ein hochorganisiertes Kompartiment und ist in strukturelle und funktionelle Kerndomänen unterteilt, die dynamisch miteinander wechselwirken (Lamond und Earnshaw, 1998). Viele dieser Kernstrukturen konnten mit biochemischen Prozessen wie DNA Replikation, RNA Transkription, der Prozessierung der mRNA oder dem Zusammenbau der Ribosomen assoziiert werden. Schon bei der mikroskopischen Betrachtung können der Nukleolus und das Chromatin als Substrukturen des Zellkerns beobachtet werden. Im Nukleolus wird die rRNA synthetisiert und anschließend in die Ribosomenuntereinheiten eingebaut (Scheer und Weisenberg, 1994), während im Chromatin die DNA Replikation stattfindet. Durch den Einbau von Nukleotidanaloga in das neu synthetisierte Chromatin (Nakayasu und Berezney, 1989) oder durch Antikörper gegen Proteine, die am Replikationsprozeß beteiligt sind (Bravo und McDonald-Bravo, 1987), können in der S-Phase des Zellzyklus hunderte spezifische Replikationszentren nachgewiesen werden. Eine weitere Gruppe von Kerndomänen stellen die Spleißosomen dar, deren Hauptuntereinheiten, die snRNPs (small nuclear ribonucleoprotein particles), sowohl in nukleären Substrukturen als auch diffus im Zellkern organisiert sind (Spector, 1996). Die diffuse Lokalisierung könnte dabei von der Interaktion der Spleißosomen mit aktiv transkribierter RNA abhängen, da eine Blockade der Transkription diese Lokalisierung verhindert. Die Funktion der punktierten

Strukturen der Spleißosomen wird noch diskutiert. Sie könnten aber beispielsweise inaktive Faktoren des Spleißprozesses lagern (Lamond und Earnshaw, 1998). Durch die systematische Charakterisierung von Autoimmunantikörpern, die selektiv zelluläre Domänen markieren, wurde ein neuer Typ von Kernstrukturen entdeckt (Sternsdorf et al., 1997a), der ursprünglich als NDs (nuclear domains) und später als PML onkogene Domäne (POD), ND10 Domäne oder Kr Körper (Kremer Körper) bezeichnet wurde.

5.1 PML onkogene Domänen

PML onkogene Domänen (PODs) lokalisieren im Kern der Zelle in 10-30 distinkten Domänen, deren Morphologie von der Zellzyklusphase abhängt (Stuurman et al., 1992). Sie sind wahrscheinlich an die Kernmatrix gebundenen, da sie gegen Nukleasen resistent sind und nach der Zellfraktionierung hauptsächlich in der unlöslichen Fraktion nachzuweisen sind (Stuurman et al., 1992; Hodges et al., 1998a). Bis heute wurden eine Vielzahl an POD assoziierten Faktoren beschrieben, die alle in die verschiedensten zellulären Prozesse involviert sind und damit den PODs eine breite Palette an denkbaren Funktionen ermöglichen. Neben den Komponenten PML und SP100, die entscheidend zur Charakterisierung der PODs beitragen, wurden Transkriptionsfaktoren, chromosomale Proteine, Tumorrepressoren, Proto-Onkogene und anti-apoptotische Faktoren als POD assoziierte Faktoren entdeckt (Zhong et al., 2000; Seeler und Dejean, 1999). Die Hauptkomponente der POD Multiproteinkomplexe ist das RING-Finger Protein PML, das ursprünglich durch seine Verbindung zur akuten promyelozytischen Leukämie (APL) entdeckt wurde (de The et al., 1991; Goddard et al., 1991; Kakizuka et al., 1991). Deshalb wird unter anderem angenommen, daß POD Domänen funktionell an der Modulation des Zellwachstums beteiligt sind. Die Leukämiezellen zeigen in ihrem Genotyp eine t(15;17) Translokation, die den N-Terminus des PML Proteins an den Retinolsäurerezeptor α (RAR α) fusioniert. Das Fusionsprotein zerstört möglicherweise durch die Bildung eines Heterodimers mit PML die gewöhnliche PML Organisation und PML formiert dadurch hunderte kleine Partikel. Die Behandlung der transformierten Zellen mit Retinolsäure führt zum Wiederaufbau der Kerndomänen durch die Relokalisierung ihrer einzelnen Komponenten und führt zur Rückbildung der Leukämie (Dyck et al., 1994; Koken et al., 1994; Weis et al., 1994; Melnick und Licht, 1999; He et al., 1999; Lin et al., 1999). Zellulärer Streß in Form von Hitzeschock oder Entzündungen verändert ebenfalls die Organisation der PODs (Seeler und Dejean, 1999). Während des Zellzyklus kommt es in der Mitose zur fast vollständigen Auflösung der PODs, die sich in der G1-Phase rasch wieder

aufbauen (Ascoli und Maul, 1991; Terris et al., 1995). PODs sind demnach hochdynamische Domänen, deren Organisation auf veränderte innere und äußere Bedingungen reagiert. Eine Voraussetzung für diese Dynamik ist der zügige und kontrollierte Im- bzw. Export einzelner Komponenten dieser Kerndomäne. Es gibt Evidenz, daß die POD Komponente PML zwischen Zytoplasma und Zellkern pendelt (Stuurman et al., 1997) und dabei innerhalb des Zellkerns sowohl in diffuser Verteilung als auch in Kerndomänen nachgewiesen wird.

Als erster Faktor, der die Lokalisierung einer POD Komponente beeinflusst, wurde das Protein SUMO-1 (small ubiquitin related modifier 1) identifiziert. SUMO-1 gehört zur Familie der ubiquitinverwandten Proteine und bindet über ubiquitinähnliche Mechanismen kovalent an Proteine, markiert sie aber nicht wie Ubiquitin zum Abbau durch das Proteasom (Saitoh et al., 1997; Jentsch und Pyrowolakis, 2000; Hodges et al., 1998b). Die SUMO-1 Modifizierung von PML nimmt wahrscheinlich Einfluß auf die PML Lokalisierung, da unmodifiziertes PML mit der löslichen nukleoplasmatischen Fraktion der Zelle assoziiert, während SUMO konjugiertes PML eng mit nukleären Domänen assoziiert ist (Boddy et al., 1996; Müller et al., 1998; Kamitani et al., 1998; Duprez et al., 1999). Dieser Effekt der SUMO Konjugation auf die PML Lokalisierung könnte sich bei der Auflösung der PODs in der Mitose auswirken, da die Umorganisation der PODs mit einer De-SUMOylierung von PML einhergeht (Everett et al., 1999; Maul et al., 2000). Neben PML wird auch die POD Komponente Sp100 durch SUMO-1 modifiziert (Sternsdorf et al., 1997b). Im Gegensatz zu PML ist dabei die SUMO Modifizierung für die Lokalisierung von SP100 in nukleären Domänen nicht essentiell (Sternsdorf et al., 1999). Die kovalente Modifizierung von Proteinen durch SUMO-1 könnte für die Organisation der einzelnen POD Komponenten oder POD assoziierten Faktoren eine entscheidende Rolle spielen.

5.2 Assoziation viraler Genprodukte mit PODs

Die Veränderung der POD Struktur als Antwort auf eine Interferonbehandlung führte zu der Hypothese, daß PODs nukleäre Abwehrfunktionen darstellen (Guldner et al., 1992; Lavau et al., 1995; Grotzinger et al., 1996; Stadler et al., 1995; Maul et al., 1995). Viele virale Genome werden aus noch ungeklärten Gründen von Infektionsbeginn an in der Nähe von PODs beobachtet (Ishov und Maul, 1996). Eine Vielzahl von DNA Viren, z. B. SV40, Ad5 oder HSV-1 (Herpes simplex Virus 1) transportieren ihre Genome in die direkte Nachbarschaft der PODs und beginnen dort ihre Replikation und Transkription (Maul, 1998). Neben dieser räumlichen Assoziation viraler Mechanismen mit PODs, beeinflusst die virale Infektion die

Organisation der PODs und strukturiert sie um. Viren kodieren dazu Proteine, die direkt mit Komponenten der PODs interagieren und meistens ihre Umstrukturierung bedingen.

Beispielsweise kolokalisiert das frühe herpesvirale Genprodukt ICP0 zunächst mit PODs und bewirkt anschließend deren Auflösung (Maul et al., 1993; Everett und Maul, 1994). Der Zerfall der PODs ereignet sich während der ersten zwei Stunden der HSV-1 Infektion und beruht wahrscheinlich auf einem proteasomabhängigen Abbau von SUMO konjugierten PML Isoformen (Everett et al. 1998a; Müller und Dejean, 1999). In Transfektionsstudien nimmt ICP0 direkt Einfluß auf den SUMOylierungsgrad der POD Komponenten PML und SP100 und bewirkt deren De-Konjugation (Müller und Dejean, 1999). Die Beziehung zwischen der SUMOylierung von PML, dem möglichen Abbau von PML durch das Proteasom und dem viralen Faktor ICP0 wird noch diskutiert. Möglicherweise stellt aber die zelluläre ubiquitinspezifische Protease HAUSP (herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease), die mit einer Subpopulation der PODs und mit ICP0 assoziiert, die Verknüpfung zwischen dem eventuell ubiquitingesteuerten Abbau von PML und dem viralen Faktor ICP0 her (Everett et al., 1997; Everett et al., 1998b). Neben dieser Interaktion des viralen Proteins ICP0 mit PML gehört ICP0 wie PML zur Familie der Zinkfinger Proteine, die ein spezielles RING Motiv besitzen. Der RING-Finger im PML Protein ist für die Lokalisierung in PODs essentiell, während ICP0 auch ohne RING-Finger in PODs lokalisiert, diese aber nicht mehr zerstört (Everett und Maul, 1994; Maul und Everett, 1994; Borden et al., 1995).

Als weitere herpesvirale Genprodukte, die in PODs akkumulieren und anschließend ihre Auflösung induzieren, wurden die frühen Proteine IE1 und IE2 des humanen Cytomegalovirus (HCMV) identifiziert (Kelly et al., 1995; Koriath et al., 1996; Ahn und Hayward, 1997). IE1 agiert wie ICP0 als Faktor, der die De-SUMOylierung von PML und SP100 bewirkt (Müller und Dejean, 1999). In Korrelation zu ICP0 beinhaltet auch IE1 ein potentiell Zinkfinger Motiv, das für die Auflösung der PODs benötigt wird (Ishov et al., 1997).

Neben der Umstrukturierung von POD Domänen während Herpesvirusinfektionen wurde eine POD Umstrukturierung auch für die Adenovirusinfektion (Ad5) beschrieben. Das frühe adenovirale Protein E4Orf3 wurde als verantwortlicher Faktor identifiziert, der PODs im Infektionsverlauf in fadenförmige Strukturen rekrutiert (Carvalho et al., 1995; Doucas et al., 1996). Im Gegensatz zu ICP0 und IE1 hat das adenovirale Protein keinen Einfluß auf den SUMOylierungsgrad von PML (Müller und Dejean, 1999). Demnach interagieren Adenoviren auch gezielt mit PODs, könnten aber einen Mechanismus bei der POD Umstrukturierung benutzen, der sich von dem der Herpesvirusinfektion unterscheidet.

6. Zielsetzung und Vorgehensweise der Arbeit

Die baculoviralen Proteine IE2 und PE38 lokalisieren in transfizierten Insektenzellen in nukleären Domänen, die sich über den gesamten Zellkern verteilen (Krappa et al., 1995). Dabei ist die subzelluläre Lokalisierung von IE2 und PE38 im Infektionsverlauf und deren funktionelle Bedeutung bisher unklar.

Daher war es Ziel dieser Arbeit, die Lokalisierung von IE2 und PE38 funktionell an zelluläre oder virusinduzierte Kernstrukturen zu knüpfen und damit neue Erkenntnisse über die Interaktion der baculoviralen Genprodukte IE2 und PE38 mit funktionellen Kernstrukturen und mögliche IE2 und PE38 Funktionen im Infektionsverlauf zu erhalten.

Zunächst wurde die Kernlokalisierung von IE2 und PE38 im Infektionsverlauf und ihre potentielle Kolo-kalisierung in gemeinsamen Domänen analysiert.

Als potentiell assoziierte Kerndomänen auf zellulärer Ebene wurde die Assoziation von IE2 und PE38 mit PODs untersucht. Dabei stand die Frage im Vordergrund, ob die baculoviralen Proteine ähnlich wie frühe Proteine säugerspezifischer Viren das Potential besitzen, im Infektionsverlauf mit PODs zu assoziieren. Als Marker potentieller PODs der Insektenzelle wurde die Assoziation mit PML, der am besten charakterisierten Komponente der PODs aus Säugerzellen, untersucht. In *Drosophila* Zellen lokalisiert transient exprimiertes PML in nukleären Domänen, so daß eine Konservierung von PML Kernstrukturen in Invertebraten möglich ist (Dyck et al., 1994; Lehembre et al., 2000). Zur Kennzeichnung potentieller PODs im Infektionsverlauf wurde ein rekombinantes Virus hergestellt, das humanes PML unter der Kontrolle des pe38 Promotors exprimiert.

Auf viraler Ebene sollte der Zusammenhang zwischen der IE2 und PE38 Kernlokalisierung und viralen Replikationszentren untersucht werden, da sowohl für IE2 als auch für PE38 eine stimulierende Wirkung auf die Replikation in Plasmidreplikationsexperimenten beschrieben wurde.

Neben der Analyse der IE2 und PE38 Lokalisierung in funktionellen Kerndomänen wurden im Verlauf dieser Arbeit Hinweise auf eine mögliche Konservierung POD homologer Kerndomänen in Insektenzellen gesammelt, um damit potentielle IE2 und PE38 Funktionen an neue strukturelle Kernkomponenten der Wirtszelle zu koppeln.

II. Material

1. Chemikalien

Aceton	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose (Standard, für Agarosegele)	Eurobio, Les Ulis Cedex, B
Agarose (SeaPlaque)	FMC, Rockland, USA
Ammoniumperoxydisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Grünenthal, Stolberg
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto-Yeast-Extract	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bradford-Reagenz	Bio Rad Laboratories, Richmond, USA
BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Baker Chemicals, Deventer, NL
CellFECTIN Reagenz	GibcoBRL, Karlsruhe
Chloroform	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
Complete™ (Proteinase-Inhibitorcocktail)	Boehringer, Mannheim
DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate (dNTPs)	Boehringer, Mannheim
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
D,L-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNA-Größenmarker (1 kb-Leiter)	GibcoBRL, Karlsruhe
EDTA (Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Baker Chemicals, Deventer, NL
Essigsäure	Fischer Scientific, Düsseldorf
Ethanol	Baker Chemicals, Deventer, NL
Ethanolamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Calbiochem, Los Angeles, USA
Guanidiniumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin	Baker Chemicals, Deventer, NL
Glycin	Baker Chemicals, Deventer, NL
Harnstoff	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hepes (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Baker Chemicals, Deventer, NL
Kaliumacetat	Fisher Scientific, Loughborough, UK
Kaliumchlorid	Baker Chemicals, Deventer, NL
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Lipofectamine™ Reagenz	GibcoBRL, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Baker Chemicals, Deventer, NL
Manganchlorid 4-Hydrat	Baker Chemicals, Deventer, NL
Methanol	Baker Chemicals, Deventer, NL
Milchpulver (aus Magermilch)	Glücksklee, München

MOPS (3-[N-Morpholino]propansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat (NaAc)	Baker Chemicals, Deventer, NL
Natriumchlorid	Baker Chemicals, Deventer, NL
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Baker Chemicals, Deventer, NL
Natriumhydrogencarbonat	Baker Chemicals, Deventer, NL
Natriumhydroxid	Baker Chemicals, Deventer, NL
Neutralrotlösung	Sigma, Irvine, UK
Nonidet P40 (NP40)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin-Lösung	GibcoBRL, Karlsruhe
Phenol	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
PLUS Reagenz	GibcoBRL, Karlsruhe
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rubidiumchlorid	Merck, Darmstadt
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Thimerosal (2-[(Ethylmercurio)-thio-]benzoesäure Natriumsalz)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol)	Eurobio, Les Ulis Cedex, B
Triton-X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol)	Sigma, Steinheim
Tryptose Broth	DIFCO, Detroit, USA
Tween 20 (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate)	Sigma-Aldrich, Steinheim
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zinkacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim

2. Puffer, Lösungen, Medien

Acrylamid-Lösung	37,5 : 1 30 % 0,8 % in 1 l H ₂ O	Acrylamid Bisacrylamid
Antikörperkopplung: Puffer A	0,5 M 0,5 M pH 8,5	Ethanolamin NaCl
Puffer B	0,1 M 0,5 M pH 4	NaAc NaCl
Bradford-Reagenz (Bio Rad Protein Assay Lösung)	0,01 % 4,7 % 8,7 %	Coomassie G-250 Ethanol Phosphorsäure
BrdU-Medium	50 μM BrdU in TC-100 Medium	

BSA-Lösung (2 %)	2 g BSA in 100 ml PBS
Chloroform	gesättigt mit 100 mM Tris/HCl, pH 7,5
DABCO-Einbettmedium	2,3 % DABCO 90 % Glycerin 10 % PBS
Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate	10 mM in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5
Dulbecco`s Säugerzellkulturmedium (Dulbecco`s modified eagle medium)	siehe Katalog der Firma Gibco, BRL
EDTA-Lösung	0,5 M EDTA in H ₂ O, pH 8,0
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml in H ₂ O
Glycin-Lösung	0,1 M Glycin in PBS
HBS-Puffer (2x, pH 7,17)	280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ 50 mM Hepes 700 mM Tris/HCl, pH 7,5 100 mM MgCl ₂ 1 mM KCl 50 mM DTT
IP-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 8,5 200 mM NaCl 100 mM Zinkacetat 1 mM DTT 0,25% Gelatine 1 x Complete
Grace`s Insect TC-Medium without hemolymph	siehe Katalog der Firma Gibco, BRL
Kälberserum, fötal (fetal calf serum, FCS)	Boehringer, Mannheim 68x, Seromed, Berlin
Kopplungspuffer	0,2 M NaHCO ₃ 0,5 M NaCl pH 8,3
L-Agar	L-Broth mit 12,5 g/l Bacto-Agar
L-Broth (LB-Medium)	10 g Bacto-Tryptone 5 g Bacto-Yeast Extract 5g NaCl pro Liter H ₂ O

Milchpulver-Lösung (5 %)	5 g Milchpulver in 100 ml PBS-T
NOV-Präparationspuffer	0,1 M Tris/HCl pH 7,5 12,5 mM EDTA 0,15 M NaCl 1 % SDS
Optimem Säugerzellmedium	siehe Katalog der Firma Gibco, BRL
Paraformaldehyd-Lösung (2 %)	2 g Paraformaldehyd in 100 ml PBS
PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)	140 mM NaCl 3 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄
PBS-T	PBS mit 0,1 % Tween-20
Phenol	gesättigt mit 100 mM Tris/HCl, pH 7,5
Plaque-Medium	TC100-Medium mit doppelter Aminosäure- und Vitaminkonzentration
Proteinase K-Lösung	5 mg/ml in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5
Proteinreinigung: Puffer A	6 M GuHCl 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 0,01 M Tris/HCl, pH 8
Puffer B	8 M Harnstoff 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 0,01 M Tris/HCl, pH 8
Puffer C	8 M Harnstoff 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 0,01 M Tris/HCl, pH 7 oder pH 6,3
Puffer D	8 M Harnstoff 0,1 M NaH ₂ PO ₄ 0,01 M Tris/HCl, pH 5
RF1-Puffer	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ * 4 H ₂ O 30 mM KAc 10 mM CaCl ₂ * 2 H ₂ O 15 % Glycerin pH 5,8

RF2-Puffer	10 mM 10 mM 75 mM 15 % pH 6,8	MOPS RbCl CaCl ₂ * 2 H ₂ O Glycerin
RIPA-Puffer	50 mM 100 mM 3 mM 1 % 1 µg/ml	Tris/HCl, pH 8,0 NaCl MgCl ₂ NP-40 Aprotinin
Roger-Puffer	50 mM 200 mM 100 mM 1 mM 1 x	Tris/HCl, pH 8,5 NaCl Zinkacetat DTT Complete
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM 250 mM 0,1 %	Tris/HCl Glycin SDS
4 x SDS-PAGE Probenpuffer	0,23 M 7,5 % 8 % 0,004 % 0,04 M	Tris/HCl SDS Glycerol Bromphenolblau DTT
Stop-Lösung für Restriktionsendonukleasen	100 mM 1 % 50 % 0,1 %	EDTA, pH 8,0 SDS Glycerin Bromphenolblau
TBN-Puffer	10 mM 140 mM 3 mM 0,5 % 1 µg/ml	Tris/HCl, pH 6,5 NaCl MgCl ₂ NP-40 Aprotinin
TC-100 Insektenzellkulturmedium	(s. Gardiner und Stockdale, 1975)	
TE-Puffer	10 mM 1 mM	Tris/HCl EDTA, pH 8,0
Tris-Saline	13,7 mM 5 mM 0,3 mM 25 mM 0,1 %	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ Tris/HCl, pH 7,4 Glucose

Triton-Lösung	0,1 %	Triton-X-100 in PBS
Blot-Puffer	25 mM 192 mM 10 %	Tris Glycin Methanol
X-Gal	20 mg/ml in Dimethylformamid	
2 x YT-Medium	1 % 1% 1,6 %	NaCl Bacto-Hefeextrakt Bacto-Trypton

3. Enzyme

Für die Reaktionen mit Restriktionsenzymen wurden in dieser Arbeit die von den Firmen mitgelieferten Reaktionspuffer verwendet. Die Inkubation erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Restriktionsenzyme:

Asp718	Boehringer, Mannheim
BglII	Boehringer, Mannheim
BamHI	Boehringer, Mannheim
Bsu36I	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
ClaI	Boehringer, Mannheim
EcoRI	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
XhoI	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
XbaI	Boehringer, Mannheim

Andere Enzyme:

DNA Polymerase (Pwo)	Roche, Molecular Biochemicals, Mannheim
Phosphatase	Boehringer, Mannheim
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim
RNase A	Sigma-Aldrich, Steinheim
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
Taq Polymerase	Promega, Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Klenow Enzym	Boehringer, Mannheim
Benzonase	Merck, Darmstadt

4. Plasmide und Primer

4.1 Plasmide

pUC-8/6/8	Laborsammlung D. Knebel-Mörsdorf
pUC-ME53LacZ	Laborsammlung D. Knebel-Mörsdorf
pBS (pBluescriptSK(-))	Laborsammlung D. Knebel-Mörsdorf
pFHC-HR1	Laborsammlung D. Knebel-Mörsdorf
pPE38-HR1	Laborsammlung D. Knebel-Mörsdorf
pPst-N	Laborsammlung D. Knebel-Mörsdorf
pQE-PE38	Laborsammlung D. Knebel-Mörsdorf
pQE-IE2	Laborsammlung D. Knebel-Mörsdorf
pSG5-PML	Geschenk von A. Dejean, Institut Pasteur, Paris Cedex, Frankreich
pSCTEV3S	Geschenk von W. Schaffner, Universität Zürich, Zürich, Schweiz

4.2 Primer

PCR Primer wurden von der Firma GibcoBRL, Karlsruhe bezogen oder wurden aus der Laborsammlung von D. Knebel-Mörsdorf zur Verfügung gestellt.

SV40 Primer: 5'-GCATTCTAGTTGTGGTTTGTCC-3'

ph-right Primer: 5'-GGTATGAATAATCCGGC-3'

ph-rightII Primer: 5'-GACGGTATGAATAATCCGGC-3'

PMLI Primer: 5'-CAGCGCAGAACTGGA ACTCC-3'

ph Primer: 5'-GCTATTTTCTGGTAGTTCTTCGG-3'

PE38-Xho-left Primer: 5'-TTTTTCTCGAGATCTCTACGATTTGTAGAGATTG TACTGT-3'

PE38-Xho-right Primer: 5'-GGGGGCTCGAGATTGGCAGGCTCTCCGTGTT CAC-3'

ME53-Xho-right Primer: 5'-GGGGGCTCGAGTGTA ACTGTTAGTTAGCACTCAGAA-3'

5. Zelllinien, Bakterienstämme und Viren

5.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

Insektenzelllinie TN-368 (Hink, 1970)

Zellen der 266. Zellkulturpassage wurden von A. Gröner, Höchst AG, zur Verfügung gestellt.

Insektenzelllinie IPLB-Sf21 (Vaughn et al., 1977)

Zellen der 79. Zellkulturpassage wurden von J. Vlak, Universität Wageningen, Niederlande, zur Verfügung gestellt.

Säugerzelllinie BHK21

BHK21 Zellen wurden von der American Type Culture Collection, Manassas, USA (ATCC) bezogen.

Säugerzelllinie HeLa

HeLa Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig (DSMZ) bezogen.

5.2 Bakterienstämme

DH5 α

Firma GibcoBRL, Karlsruhe

M15Rep4

Firma Qiagen, Hilden

5.3 Viren

Das erste Isolat des *Autographa californica* Kernpolyedervirus (AcMNPV) wurde von Vail et al. (1971) beschrieben. Das Plaquesolat E, mit dem alle Experimente dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurde von Tjia et al. (1979) aus infektiösem Zellkulturmedium gereinigt. A. McIntosh, Rutgers University, USA stellte dem Labor dieses Inokulum zur Verfügung.

Die AcMNPV Rekombinante AcMNPV/PE38 (Knebel-Mörsdorf et al., 1996) wurde aus der Laborsammlung von D. Knebel-Mörsdorf bereitgestellt.

Die AcMNPV Rekombinanten AcMNPV-PML/l und AcMNPV-PML/e wurden im Verlauf dieser Arbeit hergestellt.

6. Antiseren, Antikörper und Proteinstandards

6.1 Primäre Antikörper

IE2 Antiserum (Kaninchen)

Das polyklonale Antiserum gegen das AcMNPV Protein IE2 (Krappa et al., 1995) wurde aus der Laborsammlung von D. Knebel-Mörsdorf zur Verfügung gestellt.

IE2 Antiserum (Maus)

Das polyklonale Antiserum gegen das AcMNPV Protein IE2 wurde im Verlauf dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von A. Rziha, BFA für Viruserkrankungen, Tübingen hergestellt.

PE38 Antiserum (Kaninchen)

Das polyklonale Antiserum gegen das AcMNPV Protein PE38 (Krappa et al., 1995) wurde aus der Laborsammlung von D. Knebel-Mörsdorf zur Verfügung gestellt.

DBP Antiserum (Kaninchen)

Das polyklonale Antiserum gegen das BmNPV Protein DBP (Okano et al., 1999) wurde von Keiju Okano, RIKEN, Wako, Saitama, Japan zur Verfügung gestellt.

LEF-3 Antiserum (Kaninchen)

Das polyklonale Antiserum gegen das AcMNPV Protein LEF-3 (Evans und Rohrmann, 1997) wurde von G. F. Rohrmann, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA zur Verfügung gestellt.

PML Antikörper mAB5E10

Der monoklonale Antikörper mAB5E10 gegen das humane PML Protein (Stuurman et al., 1992) wurde von R. van Driel, Universität Amsterdam, Amsterdam, Niederlande zur Verfügung gestellt.

PML Antiserum (Kaninchen)

Das polyklonale Antiserum gegen das humane Protein PML (Weis et al., 1994) wurde von A. Dejean, Institut Pasteur, Paris Cedex, Frankreich zur Verfügung gestellt.

BrdU Antikörper Klon B44

Der monoklonale Antikörper gegen BrdU (Bromodeoxyuridin) wurde von der Firma Becton Dickinson, San Jose, CA, USA bezogen.

SUMO Antiserum (Kaninchen)

Das polyklonale Antiserum gegen das *Drosophila* Protein dSmt3 (Lehembre et al., 2000) wurde von A. Dejean, Institut Pasteur, Paris Cedex, Frankreich zur Verfügung gestellt.

6.2 Sekundäre Antikörper

Der FITC-gekoppelte anti-Kaninchen spezifische Antikörper des Typs IgG (ganzes Molekül) aus Schweinen wurde von der Firma Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Niederlande bezogen.

Der Cy3-gekoppelte anti-Kaninchen spezifische Antikörper des Typs IgG (ganzes Molekül) aus Schafen wurde von der Firma Sigma, St. Louis, USA bezogen.

Der FITC-gekoppelte anti-Maus spezifische Antikörper des Typs IgG (Fc spezifisch) aus Schafen wurde von der Firma Sigma, St. Louis, USA bezogen.

Der Cy3-gekoppelte anti-Maus spezifische Antikörper des Typs IgG (ganzes Molekül) aus Schafen wurde von der Firma Sigma, St. Louis, USA bezogen.

Der HRP-gekoppelte anti-Kaninchen spezifische Antikörper des Typs IgG (ganzes Molekül) aus Eseln wurde von der Firma Amersham, Life Science, Buckinghamshire, UK bezogen.

Der HRP-gekoppelte anti-Maus spezifische Antikörper des Typs IgG (ganzes Molekül) aus Eseln wurde von der Firma Amersham, Life Science, Buckinghamshire, UK bezogen.

6.3 Proteinstandards

SDS 7B	Sigma-Aldrich, Steinheim
BenchMark™ Prestained Protein Ladder	GibcoBRL, Karlsruhe

7. Geräte und sonstiges Material

Blaukappröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon, Becton Dickinson, Plymouth, UK
Centricon-10 Concentrators	Amicon GmbH, Witten
Cryo-Röhrchen	Greiner, Solingen
Deckgläser (20 x 20 mm)	Menzel
Diafilme Ektachrome 400HC	Kodak, England
Durchlichtmikroskop	Leitz, Wetzlar
Elektroblotter (The Bandit™ Tank)	Peqlab, Erlangen
Entwicklermaschine (Curix 60)	AGFA, Köln
Geldokumentationsgerät	Pharmacia Biotech, Cambridge, England
Gelkammer (für Polyacrylamidgele)	Hoefler Scientific, San Francisco, USA
Gewebekulturflaschen	Falcon, Becton Dickinson, Plymouth, UK
(25 cm ² , 75 cm ² , 75 cm ² mit Gasaustauschkappe)	LePont De Claix, Frankreich
Gewebekulturplatten (6 und 24 Loch)	Falcon, New Jersey, USA
Gewebekulturschalen (60 x 15 mm,)	Falcon, Becton Dickinson, Plymouth, UK
Hamilton-Spritze	Hamilton, Reno, USA
Handschuhe	Meditrade und N-Dex, Aartselaar, B

Heizblock (Digi-Block)	neoLab, Heidelberg
HiTrap-Affinitätssäulen	Pharmacia, Freiburg
Immunfluoreszenzmikroskope:	
Axiovert 135	Zeiss, Jena
BH2-RFC	Olympus
Inkubatoren:	
Bakterien	Heraeus, Hanau
Insektenzellkulturen	WTB Binder, Tuttlingen
Säugerzellkulturen	WTB Binder, Tuttlingen
Kameras:	
SC 35 Typ12	Olympus
167MT	Contax, Tokyo, Japan
Digitalkamerasystem ORCA 100 III	Intas, Göttingen
Kanülen	Terumo
„KITS“:	
ECL™ Detektions-Kit	Amersham, Buckinghamshire, UK
ECLplus Detektions-Kit	Amersham, Buckinghamshire, UK
Plasmid-Maxi-Kit	QIAGEN, Hilden
Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopsysteme:	
LSM 4 mit Zeiss Software	Zeiss, Jena
DM IRBE Mikroskop mit TCS-SP Einheit	Leica, Bensheim
Kulturschüttler (Orbital shaker)	Farma Scientific, Life Sciences International, Frankfurt
Küvetten (1,5 ml)	Brand, Wertheim
Magnetrührer	Heidolph, Kelheim
Minicycler PTC-150 (für PCR)	Biozym, Oldendorf
Nagellack	Jade, Düsseldorf
NAP 10 Säulen	Pharmacia, Freiburg
Ni-NTA Matrix	Qiagen, Hilden
Nitrozellulosemembran (Hybond ECL)	Amersham, Buckinghamshire, UK
Objektträger (76 x 26 mm)	Menzel
Parafilm „M“	American Can Comp., Greenwich, USA
Petrischalen	Falcon, Becton Dickinson, Plymouth, UK
pH-Meter	WTW, Weilheim
Photometer:	
Novaspec II	Pharmacia Biotech, Cambridge, England
GeneQuant	Pharmacia Biotech, Cambridge, England
Pinzetten	Millipore, Eschborn
Power supply:	
ESPS 3000/150	Pharmacia, Freiburg
GPS 200/400	Pharmacia, Freiburg
Quarzküvetten	Pharmacia, Freiburg
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (aus Polystyrene, 5 ml)	Falcon, Meylan Cedex, Frankreich
Röntgenfilme	Kodak, Stuttgart
Skalpelle	Bayha, Tuttlingen
Spritzen (20 G, 26 G)	HSW, Tuttlingen
Sterilbank	Nunc, Wiesbaden
Sterilfilter-Einmalfilter (0,2 µm und 0,45 µm Porengröße)	Schleicher & Schuell, Dassel

Sterilfilter (Nalgene Disposable Filterware)	Nalgene, Rochester, USA
UV-Lampe	Herolab
Vortex	Bender & Hobein, Zürich
Wasserbäder	GFL, Burgwedel
Weißkappröhrchen (12 ml PPN-Röhrchen)	Kleef, Bonn
„Whatman“-Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Wipptisch (Mini Rocking Platform)	Biometra, Göttingen
Zählkammer (Neubauer)	Brand, Wertheim
Zentrifugen	Hettich, Tuttlingen
	Heraeus, Osterode
	Sorvall, Bad Homburg

III. Methoden

1. Zellkulturen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die verwendeten Lösungen und Zellkulturmedien wurden auf die entsprechende Inkubationstemperatur der Zelllinie vorgewärmt. Es wurden Gewebekulturflaschen (Falcon) der Größen 25 cm², 75 cm² und 175 cm² und autoklavierte Pipetten, Glasgefäße und Gummischaber verwendet.

1.1 Kultivierung der Insektenzelllinien TN-368 und IPLB-Sf21

→ Murges, D., Diplomarbeit, 1997.

1.2 Kultivierung der Säugerzelllinie BHK21

→ Murges, D., Diplomarbeit, 1997.

1.3 Kultivierung der Säugerzelllinie HeLa

Die Säugerzelllinie HeLa wurde bei 37°C und 5 % CO₂ in einer humiden Atmosphäre kultiviert. Alle 2-3 Tage wurden die Zellen in PBS gewaschen und zum Ablösen der Zellen mit einer 0,25 %igen Trypsin-Lösung behandelt. Anschließend wurden die HeLa Zellen 1:5 in frischem Dulbecco's modifiziertem Medium (GibcoBRL), das 1 % Antibiotika (Penicillin und Streptomycin) und 10 % fötales Kälberserum (Boehringer) enthielt, verdünnt.

1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

→ Murges, D., Diplomarbeit, 1997.

1.5 Bestimmung der Zellzahl

→ Murges, D., Diplomarbeit, 1997.

1.6 Testen der Zellkultur auf Mykoplasmen

→ Murges, D., Diplomarbeit, 1997.

1.7 Markierung der Insektenzelllinie TN-368 mit BrdU

BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin) ist ein Nukleotidanalogen, das während der Replikation anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird und damit zur Markierung sich replizierender DNA Bereiche benutzt werden kann. Zur Markierung von Insektenzellen mit BrdU wurden TN-368 Zellen auf 20 x 20 mm Deckgläsern ausgesät (5×10^4 Zellen pro Deckglas) und über Nacht auf 27°C inkubiert. Eine Stunde vor der Fixierung wurde das Kulturmedium der Zellen gegen 1 ml TC-100 Medium, das 10 % FCS und 50 µM BrdU enthielt, ersetzt. Zur Markierung viraler Replikation wurden infizierte Zellen ebenfalls eine Stunde vor der Fixierung mit BrdU markiert. Vor der Fixierung wurden sowohl uninfizierte als auch infizierte BrdU markierte Zellen 3 x in PBS gewaschen und anschließend in 2 % Paraformaldehyd fixiert.

2. Arbeiten mit AcMNPV

2.1 Herstellung von Virusinokulum

→ Murges, D., Diplomarbeit, 1997.

2.2 Bestimmung der Infektiosität des Inokulums, Plaque-Test

→ Murges, D., Diplomarbeit, 1997.

2.3 Infektion von TN-368 Zellen

Zur Präparation von Proteinextrakten aus infizierten TN-368 Zellen wurden zu 70 % konfluente Gewebekulturflaschen (75 cm^2) bei einer M.O.I. von 10-20 mit AcMNPV bzw. AcMNPV-PML/e infiziert. Das Medium der Zellen wurde dazu auf 10 ml reduziert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von Inokulum infiziert und bis zur Extraktpräparation bei 27°C inkubiert. Der Zeitpunkt der Zugabe des Inokulums wurde als Zeitpunkt 0 h p.i. definiert.

Für indirekte Immunfluoreszenzstudien in infizierten Zellen wurden TN-368 Zellen auf 20 x 20 mm Deckgläsern in 6-Lochgewebekulturplatten ausgesät (5×10^4 Zellen pro Deckglas). Das Zellmedium wurde vor der Infektion auf 1 ml reduziert. Anschließend wurden

die Zellen bei einer M.O.I. von 10-20 mit AcMNPV oder AcMNPV-PML/e infiziert. Der Zeitpunkt der Zugabe des Inokulums wurde als Zeitpunkt 0 h p.i. definiert. Anschließend wurden die Zellen bis zur Fixierung in 2 % Paraformaldehyd auf 27°C inkubiert.

2.4 Herstellung von Virusrekombinanten

Virusrekombinanten wurden durch homologe Rekombination hergestellt. Dazu wurden Transfervektoren, die eine genetisch veränderte polyhedrin Genregion des AcMNPV Genoms beinhalten, zusammen mit viraler DNA in Sf21 Zellen transfiziert. Durch Rekombination zwischen homologen Sequenzen der polyhedrin Genregionen der Vektor DNA und der viralen DNA wurde die polyhedrin Genregion des Virusgenoms durch die genetisch veränderte Region des Transfervektors ersetzt. Anschließend wurde das rekombinante Virus in Plaque-Tests vom Ausgangsvirus mit Hilfe eines Markergens isoliert. Als Markergen wurde das lacZ Gen aus *E. coli* verwendet. Es befand sich entweder auf dem Virusgenom und wurde durch die Rekombination deletiert oder auf dem Transfervektor und wurde zusammen mit der genetisch veränderten Region in das Virusgenom inseriert. Mit Hilfe einer blau/weiß Selektion konnten anschließend rekombinante Viren von Ausgangsviren getrennt werden.

Die in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Viren AcMNPV-PML/l und AcMNPV-PML/e beinhalten den cDNA Klon B16 des humanen Gens pml (de The et al., 1991) unter Kontrolle des pe38 Promotors in der polyhedrin Genregion. Im Unterschied zum Virus AcMNPV-PML/l enthält das Virus AcMNPV-PML/e neben der pe38/pml Genkassette eine Markergenkassette, die aus dem me53 Promotor und dem lacZ Gen zusammengesetzt ist. Beide Kassetten liegen Kopf an Kopf auf dem Virusgenom. Auf transkriptioneller Ebene werden sowohl die pe38/pml Genkassetten als auch die me53/lacZ Markergenkassette vom SV40 Terminationssignal terminiert. Schematische Darstellungen der homologen Rekombination zur Herstellung der rekombinanten Viren zeigen die Abbildungen 5 und 6.

2.4.1 Herstellung des rekombinanten Virus AcMNPV-PML/l

Das rekombinante Virus AcMNPV-PML/l wurde durch homologe Rekombination zwischen dem Transfervektor pUC-PE38PML (Abschnitt 3.10) und der viralen DNA des rekombinanten Virus AcMNPV/PE38 (Knebel-Mörsdorf et al., 1996) hergestellt. Das Virus AcMNPV/PE38 trägt in seiner polyhedrin Genregion eine pe38 Promotor lacZ

Markergenkassette, die nach der Rekombination durch die pe38/PML Genkassette des Transfervektors pUC-PE38PML ersetzt wird. Da die Frequenz der homologen Rekombination generell durch freie DNA Enden erhöht werden kann, wurde das virale Genom vor der Transfektion linearisiert. Im lacZ Gen des rekombinanten Ausgangsvirus befindet sich eine einzelne Bsu36I Schnittstelle. Daher wurde zur Linearisierung der viralen DNA eine Restriktion mit dem Enzym Bsu36I durchgeführt. Es wurden ~2 µg virale DNA mit 10 Einheiten Bsu36I für 2 Stunden bei 37°C behandelt.

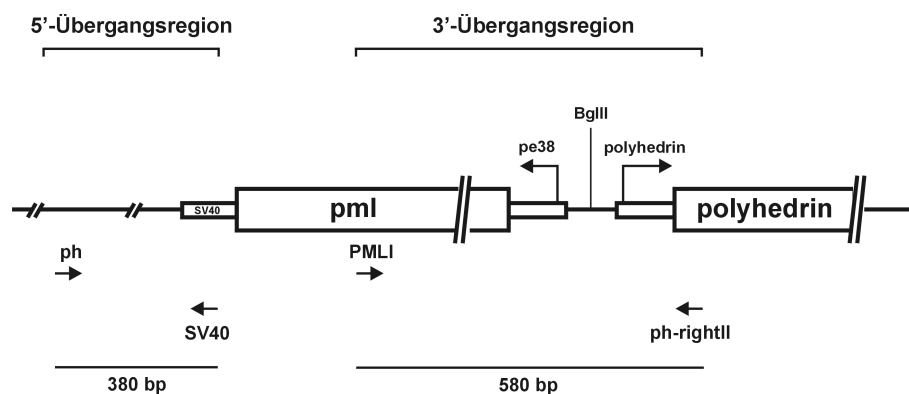
Zur homologen Rekombination in transfizierten Zellen wurden 9×10^5 Sf21 Zellen pro Vertiefung einer 6-Lochgewebekulturplatte ausgesät. Nach dem Absetzen der Zellen wurden diese zweimal in TC-100 Medium gewaschen, und anschließend wurde das Kulturmedium durch 2 ml Grace's Medium ersetzt. Die Kotransfektion der Sf21 Zellen erfolgte durch Zugabe von DNA-Liposomenkomplexen, die unter Verwendung des Transfektionsreagenz Cellfectin (GibcoBRL) hergestellt wurden. Zur Produktion der DNA-Liposomenkomplexe wurden zunächst getrennte DNA-Lösungen und Cellfectin-Lösungen hergestellt. In einem 5 ml Polysterenröhrchen wurde dazu die Lösung A angesetzt, in der 1 µg linearisierte DNA und 1 µg Transfervektor pUC-PE38PML in 100 µl Grace's Medium verdünnt wurden. Außerdem wurde die Lösung B, die 8 µl Cellfectin in 100 µl Grace's Medium enthielt, hergestellt. Anschließend wurde die Lösung A in die Lösung B gegeben, das Gemisch vorsichtig geschüttelt und zur Komplexbildung der DNA für 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die DNA-Liposomenkomplexe mit 800 µl Grace's Medium aufgefüllt. Die gewaschenen Zellen wurden mit 1 ml dieser DNA-Liposomenkomplexe überschichtet und bei 27°C inkubiert. Nach 5 Stunden wurden die Transfektionsansätze entfernt und die Zellen in 2 ml TC-100 Medium (+10 % FCS) für weitere Tage bei 27°C inkubiert.

Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen konnten vereinzelt erste Einschlußkörper in den Zellen beobachtet werden, und nach weiteren 2 Tagen wurde der Überstand abgenommen und 10^{-4} verdünnt. Mit 1 ml dieses verdünnten Virusinokulums, das zu einem bestimmten Anteil rekombinante Viren enthielt, wurden neue Sf21 Zellen in 6-Lochgewebekulturplatten infiziert. Die Adsorptionszeit betrug 1 Stunde bei RT. Anschließend wurde das Virus abgenommen und die Zellen wurden mit 5 ml eines 1:1 Gemisches Seaplaque-Agarose (~2 % in PBS) und Plaque-Medium (+20 % FCS), das zusätzlich zur Markierung lacZ exprimierender Viren 0,04 % X-Gal enthielt, überschichtet. Nach 7 Tagen waren deutlich weiße und blaue Plaques zu unterscheiden. Dabei lag das Verhältnis der weißen zu blauen Plaques zu über 50 % auf der Seite der weißen Plaques. Zur Isolierung der Virusrekombinanten AcMNPV-PML/1 wurden 12 weiße Plaques mit Hilfe einer

Pasteurpipette ausgestochen. Die virushaltigen Agarosestücke wurden in 1 ml TC-100 (+10 % FCS) überführt und über Nacht bei 4°C gelagert, damit die Viren aus der Agarose in das Zellmedium diffundierten.

Im Anschluß wurde mit der Aufreinigung des rekombinanten Virus begonnen. Dazu wurde jedes Inokulum der einzelnen Plaques 10^{-2} verdünnt und ein weiterer Plaque-Test durchgeführt, an dessen Ende wieder je ein weißer Plaque pro Plaqueinokulum isoliert wurde. Das rekombinante Virus AcMNP-PML/I wurde über Plaque-Tests (3x) solange gereinigt bis nur noch weiße Plaques zu finden waren. Anschließend wurden die 12 isolierten Plaques amplifiziert. Dazu wurden Sf21 Zellen in 6-Lochgewebekulturplatten ausgesät und mit 0,5 ml einer 10^{-4} Virusverdünnung der einzelnen Plaques infiziert. Nach einer 1-stündigen Adsorbitionszeit wurde das Virus abgenommen, den Zellen 1 ml TC-100 (+10 % FCS) zugegeben und die infizierten Zellen wurden 2 Tage bei 27°C inkubiert.

Nach der Amplifikation wurde virale DNA aus den 12 Plaqueisolaten präpariert und diese mit Hilfe der PCR Technik und Sequenzanalysen auf die korrekte Insertion der pe38/PML Genkassette untersucht. Die Sequenzen im Übergangsbereich der inserierten pe38/pml Genkassette und des viralen Genoms wurden sequenziert (5'- und 3'-Übergangsregion). Eine schematische Darstellung der amplifizierten Übergangsregionen zusammen mit den verwendeten Primerpaaren zeigt die Skizze.



Zur Amplifikation der 5'-Übergangsregion wurden die Primer SV40 und ph gewählt, so daß ein 380 bp großes Fragment amplifiziert wurde, das die erwarteten Sequenzen des SV40 Terminationssignals der pe38/pml Genkassette und Sequenzen der polyhedrin Genregion beinhaltet. Die 3'-Übergangsregion wurde mit Hilfe des Primerpaares ph-rightII/PMLI überprüft. Der Primer ph-rightII ist homolog zum polyhedrin Gen und bindet stromabwärts des polyhedrin Promotors. Dagegen erkennt der Primer PMLI Sequenzen des pml Gens. Nach erfolgreicher PCR wurde ein 580 bp großes Fragment nachgewiesen, das die erwarteten

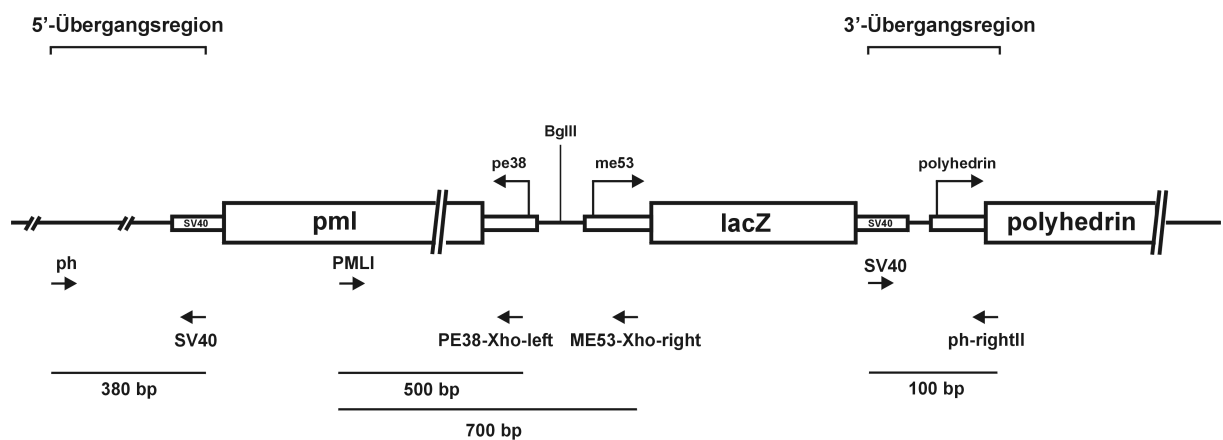
Sequenzen des pml Gens, die BglII Insertionsstelle und Sequenzen des polyhedrin Promotors enthielt. Nach der Analyse aller 12 Plaques mit Hilfe der PCR Technik und Sequenzierung der PCR Produkte wurde ein Plaque identifiziert, der die pe38/pml Genkassette vollständig trug (Plaque 9). Dieser wurde zur Herstellung des Virusinokulums AcMNPV-PML/1 verwendet.

2.4.2 Herstellung des rekombinanten Virus AcMNPV-PML/e

Das rekombinante Virus AcMNPV-PML/e wurde durch homologe Rekombination von wt AcMNPV DNA mit der DNA des Transfervektor pUC-ME53LacZ/PE38PML (Abschnitt 3.10) hergestellt. Dieser Transfervektor trägt neben der pe38/pml Genkassette eine me53/lacZ Markergenkassette, die gleichzeitig mit der pe38/pml Genkassette in die polyhedrin Genregion des wt Virus inseriert wird. Dazu wurden mit Hilfe der Cellfectintransfektion 1 µg zirkuläre AcMNPV DNA und 1 µg des Transfervektors pUC-ME53LacZ/PE38PML in Sf21 Zellen transfiziert (Protokoll 2.4.1). Nach 3 Tagen wurden in einzelnen transfizierten Zellen die ersten Einschlußkörper beobachtet und nach weiteren 2 Tagen wurde der Überstand abgenommen, der sowohl rekombinante als auch wt Viren enthielt.

Anschließend wurde der Überstand 10^{-4} verdünnt und zur Aufreinigung des rekombinanten Virus AcMNPV-PML/e in Plaque-Tests eingesetzt. Dabei wurden im Gegensatz zur Aufreinigung des rekombinanten Virus AcMNPV-PML/1 nicht weiße, sondern blaue Plaques isoliert, da das Genom von AcMNPV-PML/e zusätzlich zur pe38/pml Genkassette die me53/lacZ Markergenkassette enthält. Die Reinigung des rekombinanten Virus AcMNPV-PML/e aus dem Gemisch rekombinanter und wt Viren erfolgte im Gegensatz zur Reinigung von AcMNPV-PML/e auf 60 x 15 mm Gewebekulturschalen. Zum Plaque-Test wurde dazu ein Zehntel der Sf21 Zellen einer konfluenten Gewebekulturflasche (75 cm²) pro 60 x 15 mm Schale ausgesät und mit 1 ml Virusverdünnung (10^{-4}) infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei RT, wurde das Virus abgenommen und die Zellen mit 5 ml eines 1:1 Gemisches Seaplaque-Agarose (~2 % in PBS) und Plaque-Medium (+20 % FCS), das zusätzlich 0,04 % X-Gal enthielt, überschichtet. Nach 7 Tagen konnten blaue Plaques aus der Agarose ausgestochen werden, die einen Anteil von ca. 5 % aller Plaques darstellten. Zunächst wurden 10 blaue Plaques isoliert, deren Plaqueinokulum über Nacht in 1 ml TC-100 (+10 % FCS) eluiert wurde. Anschließend wurden die jeweiligen Plaqueinokula 10^{-2} verdünnt und über weitere Plaque-Tests (3x) gereinigt bis keine Kontamination mit weißen Plaques (wt Virus) mehr auftrat.

Anschließend wurden die Plaqueeinokula amplifiziert und die virale DNA isoliert. Zur exakten Analyse der pe38/pml-me53/lacZ Insertion wurde die isolierte DNA mit PCR amplifiziert und anschließend wurden die PCR Produkte sequenziert. Neben der PML Insertion wurden sowohl die 5'- und 3'-Übergangsregionen der gesamten Kasette, als auch die Übergangsregion zwischen der pe38/pml Genkasette und der me53/lacZ Markergenkasette untersucht. Die schematische Darstellung zeigt die Lokalisierung der amplifizierten und später sequenzierten Regionen der Insertionsstelle zusammen mit den verwendeten Primerpaaren.



Die PML Insertion wurde mit Hilfe des Primers PE38-Xho-left, der in der pe38 Promotorregion bindet und des Primers PMLI überprüft. Ein ~500 bp großes Fragment wurde amplifiziert, das die erwarteten Sequenzen zwischen pe38 Promotor und pml Gen enthielt. Die 5'-Übergangsregion der gesamten heterologen Kasette wurde wie bei AcMNPV-PML/1 mit Hilfe des Primerpaares SV40/ph amplifiziert. Das 380 bp große PCR Produkt enthielt die erwarteten Sequenzen der 5'-Übergangsregion. Zur Kontrolle der 3'-Übergangsregion der heterologen Kasette wurde der SV40 Primer, der das SV40 Terminationssignal der me53/lacZ Markergenkasette bindet und der Primer ph-rightII verwendet. Das amplifizierte 100 bp Fragment beinhaltete die erwarteten Sequenzen des SV40 Terminationssignals und des polyhedrin Promotors. Als letzte Region wurde der Übergang zwischen der pe38/pml Genkasette und der me53/lacZ Markergenkasette mit Hilfe des Primers PMLI und des Primers ME53-Xho-right überprüft. Wie erwartet wurde ein Fragment von ca. 700 bp amplifiziert, das nach der Sequenzierung die Sequenzen des pml Gens, der BglII Insertionsstelle und des me53 Promotors zeigte. Nach der Analyse aller blauen Plaques mit Hilfe von PCR und der Sequenzierung der PCR Produkte wurde Plaque 7 zur Herstellung eines AcMNPV-PML/e Virusstocks ausgewählt. Viren dieses Plaques zeigten zusätzlich zu

den erwarteten PCR Produkten nachweisbare PML Expression in Immunfluoreszenzstudien ab 3 h p.i.

3. Arbeiten mit DNA

3.1 Präparation von Plasmid DNA

3.1.1 Schnellpräparation von Plasmid DNA (LiCl-Methode)

→ Murges, D., Diplomarbeit, 1997.

3.1.2 Präparation von Plasmid DNA (CsCl-Methode)

→ Murges, D., Diplomarbeit, 1997.

3.1.3 Präparation von Plasmid DNA (Midi-Präparation, Qiagen)

→ Murges, D., Diplomarbeit, 1997.

3.2 Präparation von AcMNPV DNA aus infizierten Sf21 Zellen (CsCl-Methode)

→ Murges, D., Diplomarbeit, 1997.

3.3 Schnellpräparation viraler DNA aus extrazellulären Viren

Zur Schnellpräparation viraler DNA aus extrazellulären Viren wurden 1,5 ml Virusinokulum für 30 min, bei 4°C und 22000 x g abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 150 µl NOV-Präparationspuffer resuspendiert. Danach wurde 30 µg Proteinase K zugegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach 2-3 Phenol/Chloroform Extraktionen und einer Chloroformbehandlung wurde die virale DNA mit EtOH und NaAc für 10 min bei -70°C gefällt. Die DNA wurde anschließend durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 22000 x g und 4°C pelletiert, das Pellet bei 37°C getrocknet und in 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

3.4 Ethanolfällung von DNA

→ Murges, D., Diplomarbeit, 1997.

3.5 Phenol/Chloroform Extraktion

→ Murges, D., Diplomarbeit, 1997.

3.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

→ Murges, D., Diplomarbeit, 1997.

3.7 Klonierung von DNA Fragmenten

→ Murges, D., Diplomarbeit, 1997.

3.7.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

→ Murges, D., Diplomarbeit, 1997.

3.7.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA Fragmenten

→ Murges, D., Diplomarbeit, 1997.

3.7.3 Elution von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

→ Murges, D., Diplomarbeit, 1997.

3.7.4 Synthese und Reinigung von Oligodesoxyribonukleotiden

→ Murges, D., Diplomarbeit, 1997.

3.7.5 Kinasierung und Dephosphorylierung von DNA Fragmenten

→ Murges, D., Diplomarbeit, 1997.

3.7.6 Modifizierung von 3'-Überhängen durch T4 DNA Polymerase

→ Murges, D., Diplomarbeit, 1997.

3.7.7 Modifizierung von 5'-Überhängen durch Klenow Enzym

Nach der Behandlung der DNA mit Restriktionsenzymen wurde zum Glätten von überhängenden 5'-Enden ein Überhang mit einer normalen Polymerasekettenreaktion aufgefüllt. Dazu wurde das Klenow Fragment, die große Untereinheit der DNA Polymerase I aus *E. coli* verwendet. Es wurden 2,5 Einheiten Klenow Fragment (Boehringer) pro μg DNA,

Nukleotide (100 μM Endkonzentration je dNTP), 1 x Klenow-Puffer und H_2O in einem Endvolumen von 50 μl für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Phenol/Chloroform Extraktion durchgeführt und die DNA mit Ethanol und NaAc gefällt.

3.7.8 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation kleiner DNA Fragmente

→ Murges, D., Diplomarbeit, 1997.

Abweichend vom Protokoll der Diplomarbeit wurden die folgenden Reaktionsbedingungen bei der Amplifikation viraler DNA Sequenzen verwendet:

Denaturierung:	50 sek, 95°C
Hybridisierung:	50 sek, 55°C
Polymerisierung:	120 sek, 72°C .

3.7.9 Ligasierung von DNA Fragmenten

→ Murges, D., Diplomarbeit, 1997.

3.7.10 Herstellung hitzeschockkompetenter Zellen

(Hanahan, 1985)

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 2 ml LB-Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie des Bakterienstamms DH5 α oder M15Rep4 angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Kulturschüttler inkubiert. Die Übernachtskultur wurde in 100 ml LB-Medium 1:50 verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD_{595} von 0,4-0,5 auf dem Schüttler inkubiert. Nach dem Erreichen der optimalen Zelldichte wurde die Kultur auf Eis abgekühlt und die Zellen anschließend bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 15 ml RF1-Puffer resuspendiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut für 15 min bei 1000 x g und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 2 ml RF2-Puffer resuspendiert. Nach einer weiteren 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen aliquotiert (200 μl) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -80°C gelagert.

3.7.11 Transformation hitzeschockkompetenter Zellen mit Plasmid DNA

→ Murges, D., Diplomarbeit, 1997.

Abweichend vom Protokoll der Diplomarbeit wurde die oben beschriebene Methode zur Herstellung hitzeschockkompetenter Zellen verwendet.

3.8 Sequenzierung von Plasmid DNA

Die Sequenzierung der Plasmid DNA erfolgte in Zusammenarbeit mit B. Schmitz, Arbeitsgruppe Prof. W. Doerfler, Institut für Genetik, Köln nach der Methode von Sanger et al., 1977. Dabei wird durch PCR die zu sequenzierende DNA amplifiziert und per Zufall werden in die DNA Kopien unterschiedlich fluoreszierende Didesoxyribonukleosid-Triphosphate (ddNTPs) eingebaut. Durch den Einbau eines ddNTP in die synthetisierte DNA kommt es zu einem Kettenabbruch. Da die ddNTPs nur in geringen Mengen in der Lösung vorhanden sind, findet dieser Kettenabbruch stöchiometrisch in gleichen Mengen für jedes Nukleotid statt. Das Gemisch aus unterschiedlich langen DNA Fragmenten wird auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei können Fragmente mit einer Basenlänge Unterschied differenziert werden. Am Ende des Gels befindet sich ein Detektor, der die unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe erfasst.

Die Sequenzierungen wurden mit Hilfe eines 373A DNA Sequenzierers der Firma Applied Biosystems (Perkin Elmer) unter Verwendung des „Ready reaction dye deoxy terminator cycle sequencing-kits“ (Applied Systems) durchgeführt.

3.9 Klonierung der Plasmide pBS-pe38PML und pBS-pe38PML-HR1

Zur Herstellung des Plasmids pBS-pe38PML, das eine Variante des humanen pml Gens unter Kontrolle des baculoviralen pe38 Promotors kodiert, wurden die Plasmide pBS-PE38LacZ (Knebel-Mörsdorf et al., 1996) und pSG5-PML (de The et al., 1991) verwendet. Das Plasmid pBS-PE38LacZ enthält das LacZ Gen unter Kontrolle des pe38 Promotors mit SV40 Terminierung der Transkription. Dagegen enthält das Plasmid pSG5-PML den cDNA Klon B16 des humanen Gens pml unter Kontrolle des SV40 Promotors und SV40 Terminationssignal. Zur Klonierung des pml Gens unter pe38 Promotorkontrolle wurde aus dem Plasmid pSG5-PML ein EcoRI Fragment ausgeschnitten, das die cDNA des pml Gens zusammen mit dem SV40 Terminationssignal enthält. Zum Glätten der 5'-Enden wurde das

EcoRI Fragment mit Klenow Enzym behandelt. Anschließend wurde das Plasmid pBS-PE38LacZ mit den Restriktionsenzymen EcoRI und ClaI geschnitten, so daß im Fragment pBS-pe38LacZ(-) das lacZ Gen mit SV40 Terminationssignal deletiert wurde und der pe38 Promotor erhalten blieb. Die 5'-Überhänge des Fragments pBS-pe38LacZ(-) wurden mit Klenow Enzym aufgefüllt, und die 5'-Enden wurden dephosphoryliert. Die glatten Enden des EcoRI Fragments und des Fragments pBS-pe38LacZ(-) wurden ligasiert und das Konstrukt pBS-pe38PML hergestellt.

Das Konstrukt pBS-pe38PML-HR1 enthält im Vergleich zu pBS-pe38PML zusätzlich die homologe Region hr1. Diese wurde mit den Restriktionsenzymen ClaI und XhoI aus dem Plasmid pFHC-HR1 (Abb. 1) (Krappa et al., 1995) ausgeschnitten und mit Klenow Enzym aufgefüllt. Anschließend wurde das hr1 Fragment in die mit Klenow Enzym behandelte XbaI Schnittstelle von pBS-pe38PML kloniert. Die hr1 Region liegt stromabwärts des SV40 Terminationssignals der pe38/pml Genkassette auf dem Vektor.

3.10 Klonierung der Transfervektoren pUC-PE38PML und pUC-ME53LacZ/PE38PML

Transfervektoren dienen zur Produktion rekombinanter Viren. Sie beinhalten die heterologe Genkassette, die durch homologe Rekombination in das virale Genom inseriert wird und zusätzliche flankierende Sequenzen, über die die Rekombination stattfindet. Das polyhedrin Gen bzw. die polyhedrin Genregion ist für die Infektion von Insektenzellkulturen nicht essentiell und wird daher oft als Insertionsstelle der heterologen DNA verwendet.

Zur Herstellung rekombinanter Baculoviren, die humanes PML Protein unter Kontrolle des pe38 Promotors exprimieren, wurden die Transfervektoren pUC-PE38PML und pUC-ME53LacZ/PE38PML kloniert. Sie tragen in der polyhedrin Genregion der Ausgangsvektoren pUC-8/6/8 bzw. pUC-ME53LacZ eine pe38 Promotor pml Genkassette, die vom SV40 Terminationssignal der Transkription terminiert wird. Die Ausgangsvektoren pUC-8/6/8 und pUC-ME53LacZ enthalten ein ca. 7300 bp großes AcMNPV Fragment (EcoRI-I), das die polyhedrin Genregion beinhaltet. Zur Klonierung von heterologer DNA beinhalten beide Vektoren eine einzelne BglII Schnittstelle in der EcoRV Schnittstelle stromaufwärts des polyhedrin Gens (Gearing und Possee, 1990; Knebel-Mörsdorf et al., 1996). Gegenüber dem Vektor pUC-8/6/8 enthält das Konstrukt pUC-ME53LacZ an dieser

Stelle zusätzlich eine me53 Promotor lacZ Markergenkasette. Die pe38/pml Genkasette des Vektors pBS-pe38PML wurde jeweils in die BglII Schnittstelle der beiden Ausgangsvektoren pUC-8/6/8 und pUC-ME53LacZ kloniert, so daß die beiden Transfervektoren pUC-PE38PML und pUC-ME53LacZ/PE38PML entstanden.

Das Plasmid pBS-pe38PML enthält das pml ORF unter Kontrolle des pe38 Promotors. Zur Isolierung der pe38/pml Genkasette wurde das Plasmid pBS-pe38PML zunächst mit dem Restriktionsenzym BglII behandelt und anschließend mit dem Restriktionsenzym BamHI partiell geschnitten. Nach dem Ausschneiden eines ca. 3200 bp Fragments und der Elution der DNA wurde ein BglII-BamHI Fragment erhalten, das das pml Gen mit SV40 Terminationssignal ohne Promotorregion enthielt. Anschließend wurde dieses BglII-BamHI Fragment entweder in die dephosphorylierte BglII Schnittstelle des Vektors pUC-8/6/8 oder des Vektors pUC-ME53LacZ kloniert. Dabei wurden die Konstrukte pUC-PML und pUC-ME53LacZ/PML erhalten. Zur Insertion des pe38 Promotors wurde das Plasmid pBS-PE38PML BglII geschnitten, ein ca. 200 bp großes pe38 Promotorfragment isoliert und in die dephosphorylierte BglII Schnittstelle der Plasmide pUC-PML und pUC-ME53LacZ/PML kloniert. Dabei wurden die Transfervektoren pUC-PE38PML und pUC-ME53LacZ/PE38PML erhalten. Die Orientierung des pe38 Promotors wurde durch Sequenzanalysen überprüft. Zur Sequenzierung von pUC-PE38PML wurde der Primer ph-right verwendet, der stromabwärts der Translationsstartstelle im polyhedrin Gen bindet. Dagegen wurde der Vektor pUC-ME53LacZ/PE38PML mit Hilfe des Primers PE38-Xho-right sequenziert, der homolog zu Sequenzen im Bereich der XhoI Schnittstelle des pe38 Promotors ist.

Durch die Sequenzanalyse wurde nachgewiesen, daß die Transfervektoren pUC-PE38PML und pUC-ME53LacZ/PE38PML die pe38/pml Genkasette mit SV40 Terminationssignal stromaufwärts des polyhedrin Gens in entgegengesetzter Richtung zum polyhedrin Promotor enthalten. Der Transfervektor pUC-ME53LacZ/PE38PML enthält zusätzlich zur pe38/pml Genkasette in Kopf an Kopf Orientierung die me53/lacZ Markergenkasette. Damit homologe Rekombination in transfizierten Insektenzellen stattfinden kann, flankieren die heterologen Genkassetten auf beiden Seiten Sequenzen von über 1500 bp, die homolog zur polyhedrin Genregion sind.

3.11 Klonierung der Expressionsvektoren pCMV-IE2 und pCMV-PE38

Die Plasmide pCMV-IE2 und pCMV-PE38 exprimieren die baculoviralen Gene *ie2* und *pe38* unter Kontrolle des frühen CMV Promotor/Enhancer Elements. Zur Klonierung der Expressionsvektoren wurden die cDNAs von *ie2* und *pe38* aus dem Vektor pBluescriptSK(-) (Krappa und Knebel-Mörsdorf, 1991) mit den Restriktionsenzymen BamHI und Asp718 ausgeschnitten und in die korrespondierenden Schnittstellen des Vektors pSCTEV3S (Seipel et al., 1992) stromabwärts eines CMV Promotor/Enhancer Elements kloniert. Eine schematische Darstellung der Vektoren pCMV-IE2 und pCMV-PE38 zeigt die Abbildung 1.

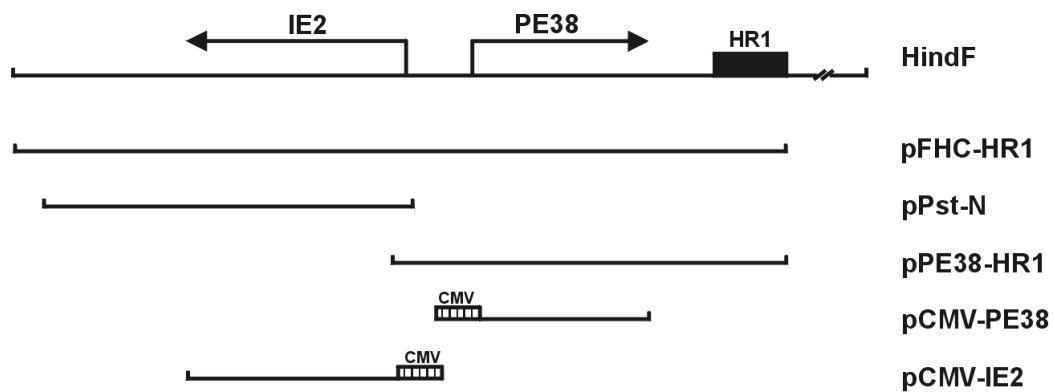


Abb. 1: Schematische Darstellung der klonierten Sequenzen der *ie2* und *pe38* Genregion

Die Plasmide pCMV-IE2 und pCMV-PE38 exprimieren PE38 und IE2 unter CMV Promotorkontrolle, während die Plasmide pFHC-HR1, pPE38-HR1 und pPst-N (Krappa et al., 1995) klonierte Fragmente der HindF Region des AcMNPV Genoms enthalten.

4. Arbeiten mit Proteinen

4.1 Präparation von Proteinextrakten aus Zellkulturen

4.1.1 Präparation von fraktionierten, detergentenbehandelten Proteinextrakten

(Jarvis et al., 1991)

Zellen einer Gewebekulturflasche (75 cm²) wurden zum Ernten mit einem Gummischaber abgeschabt und 1 min bei 1000 x g in einem Weißkappröhrchen zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Tris-Saline gewaschen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 1 min bei 4000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, während das Zellpellet in 200 µl TBN-Puffer resuspendiert und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert wurde. Bei der Inkubation wurde die Zellmembran lysiert. Zur Fraktionierung der nukleären und zytoplasmatischen Proteine wurde ein Zentrifugationsschritt von 1 Minute bei 11000 x g und 4°C durchgeführt. Der Überstand, der die zytoplasmatische Proteinfraction darstellte, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf 0,1 N NaOH eingestellt. Das Pellet, in dem sich die Zellkerne befanden, wurde in 200 µl RIPA-Puffer resuspendiert und ebenfalls auf 0,1 N NaOH eingestellt. Die DNA der Kernfraction wurde zunächst durch mehrmaliges Hochziehen der Proteinextrakte durch eine 20 G Kanüle in eine 1 ml Spritze und anschließend durch mehrmaliges Hochziehen durch eine 26 G Kanüle geschert. Zum Bradford-Test wurde je 1 µl Proteinextrakt der Kernfraction bzw. der zytoplasmatischen Fraction eingesetzt. Der Rest wurde mit 50 µl 4 x SDS-PAGE Probenpuffer gemischt und auf -20°C gelagert.

4.1.2 Präparation von Kernextrakten zur Immunpräzipitation

(Meredith et al., 1994)

Zur Präparation von Kernextrakten für Immunpräzipitationen wurde auf Detergenzien im Extraktionspuffer verzichtet und die Extrakte wurden mit Hilfe eines Dounce-Glashomogenisators hergestellt. Zellen einer Gewebekulturflasche (75 cm²) wurden zum Ernten mit einem Gummischaber abgeschabt und 1 min bei 1000 x g in einem Weißkappröhrchen zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Roger-Puffer resuspendiert und in einen 2 ml Dounce-Glashomogenisator (Größe S) überführt. Anschließend wurden die Zellmembranen durch 12 Stöße mechanisch aufgebrochen und das Homogenisat wurde bei 4°C, für 15 min und 21000 x g in einem Corex Röhrchen zentrifugiert. Der Überstand wurde

abgenommen und das Pellet, das die Zellkerne enthielt, wurde in 1 ml Roger-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellkerne mit Hilfe einer 1 ml Spritze durch je 10-maliges Hochziehen durch eine 20 G Kanüle bzw. eine 26 G Kanüle aufgebrochen. Zum Pelletieren der Zelltrümmer wurde 15 min bei 4°C und 21000 x g zentrifugiert und der Überstand wurde in je 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden bei -80°C gelagert. Zum Bradford-Test wurden 2 µl der Kernextrakte eingesetzt.

4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford-Test)

(Bradford, 1976)

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford bindet der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm ohne Protein auf 595 nm mit Protein. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung und kann photometrisch bestimmt werden. Die absoluten Konzentrationen müssen aus einer Kalibriergeraden extrapoliert werden. Zur Erstellung dieser Kalibriergeraden wurde eine Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin (BSA) verwendet, die absolute Proteinmengen zwischen 1 und 40 µg erfaßte. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer unbekanntem Proteinlösung wurde ein kleines Volumen (max. 2 µl) dieser Proteinlösung in ein Reaktionsgefäß gegeben, das Volumen mit H₂O auf 800 µl aufgefüllt und anschließend mit 200 µl Bradford-Reagenz (Bio Rad) vermischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurde die OD₅₉₅ gemessen und die Proteinkonzentration mit Hilfe der Kalibriergeraden ermittelt.

4.3 Überexpression und Reinigung von rekombinantem IE2 und PE38 aus Bakterien zur Herstellung polyklonaler anti-IE2 und anti-PE38 Mausseren

(Hochuli et al., 1987; Stüber et al., 1990)

Zur Überexpression und zur Reinigung der rekombinanten Proteine IE2 und PE38 wurde das QIAexpress-System der Firma Qiagen, Hilden verwendet. Dazu wurde zunächst der Bakterienstamm M15Rep4 mit dem Plasmid pQE-IE2 bzw. dem Plasmid pQE-PE38 transformiert. Diese Expressionsvektoren enthalten die Gene *ie2* und *pe38* in N-terminaler Fusion mit 6 Histidinresten, die zur Aufreinigung der Plasmide über eine Ni-NTA Matrix benötigt werden. Die Fusionsproteine stehen unter Kontrolle des T5 Promotors, der nach der Transformation in M15Rep4 Zellen durch den dort konstitutiv exprimierten Lac Repressor

reprimiert wird. Durch die Zugabe von IPTG wird die Repression aufgehoben und eine starke Expression der Fusionsproteine induziert.

Zur Überexpression von IE2 und PE38 wurden je 1 Liter 2 x YT-Medium (100 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin) mit einer Übernachtskultur pQE-IE2 bzw. pQE-PE38 transformierter M15Rep4 Zellen angeimpft und für ca. 3 Stunden bis zu einer OD_{595} von 0,7 bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Expression der rekombinanten Fusionsproteine durch Zugabe von 20 ml 0,1 M IPTG (Endkonzentration 2 mM) induziert. Die Bakterien wurden für weitere 4 Stunden bei 37°C auf einem Kulturschüttler inkubiert. Danach wurden die Bakterien bei 3300 x g und 4°C für 30 min pelletiert und die Pellets wurden über Nacht zum Aufbrechen der Bakterien und zur vollständigen Denaturierung der Proteine in 15 ml Puffer A unter ständigem Schütteln bei RT inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Lysate zum Abtrennen unlöslicher Bestandteile der Bakterien bei 21000 x g für 20 min zentrifugiert. Die Reinigung der Proteine erfolgte über Affinitätschromatographie über eine Ni-NTA Matrix im sogenannten Batch-Verfahren. Dazu wurden 2 ml Ni-NTA Matrix bei 50 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Matrix in 2 ml H₂O gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde die Matrix in 10 ml Puffer A für 5 min unter ständigem Schütteln equilibriert und wiederum zentrifugiert. Zur Kopplung der Fusionsproteine an die Matrix wurde das geklärte Bakterienlysat auf die sedimentierte Ni-NTA Matrix gegeben und für 1 Stunde bei RT unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 50 x g, wurde der Überstand abgenommen und die Matrix wurde 3 x 10 min in 5 ml Puffer B gewaschen. Anschließend folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt und die IE2 gebundene Matrix wurde 3 x 10 min mit Puffer C, pH 6,3 und die PE38 gebundene Matrix 3 x 10 min mit Puffer C, pH 7 gewaschen. Anschließend wurden die Proteine von der Matrix eluiert. Dazu wurde die jeweilige Matrix für 15 min in 5 ml Puffer D inkubiert, die Matrix abzentrifugiert und die Proteinlösungen abgenommen. Zur Erhöhung der Proteinkonzentration der Eluate wurden Centricon-10 Röhrchen benutzt. Es wurden je 2 ml Eluat pro Centricon-10 Röhrchen pipettiert und die Aufkonzentrierung erfolgte durch 1-stündige Zentrifugation bei 5000 x g. Anschließend wurde die Proteinkonzentration der aufkonzentrierten Eluate bestimmt.

Die rekombinanten Proteine IE2 und PE38 wurden zur Herstellung von polyklonalen IE2 und PE38 Antikörpern in Mäusen verwendet. Dazu wurden je 600 µg rekombinantes Protein eingesetzt. In Zusammenarbeit mit A. Rziha, BFA für Viruserkrankungen, Tübingen wurden

pro Protein insgesamt 10 Mäuse 3 x mit je 20 µg Protein in 3-4 Wochenabständen immunisiert. Anschließend wurden die polyklonalen Mousantisera in Westernblot Analysen getestet, und die optimalen Antikörperverdünnungen zum Nachweis der IE2 und PE38 Antigene wurde bestimmt.

4.4 Kopplung von IE2 und PE38 Antiseren an Sepharose

Zur Kopplung von Antiseren an Sepharose wurden HiTrap Affinitätssäulen (Pharmacia), die mit NHS-aktivierter Sepharose bestückt waren, verwendet. Die reaktiven Gruppen dieser Matrix sind N-Hydroxysuccinimidester, die über 6 C-Atome, die als Spacer fungieren, an die Matrix gebunden sind. Die Kopplung der Antikörper erfolgte über diese reaktiven Gruppen, die nach der Aktivierung der Säule mit primären Aminogruppen der Antikörper reagieren und diese kovalent an die Matrix koppeln. Dabei wurde die reaktive Gruppe als Abgangsgruppe von der Säulenmatrix abgespalten.

Die Antikörper wurden zunächst über eine NAP 10 Säule in Kopplungspuffer aufgenommen. Dazu wurde eine NAP 10 Säule mit 15 ml Kopplungspuffer equilibriert und 2 ml Antiserum (Kaninchen) auf die Säule gegeben. Anschließend wurden die Antikörper mit 1,5 ml Kopplungspuffer eluiert und auf 4°C gelagert. Zur Aktivierung der Säule wurde die Sepharose solange mit 1 mM HCl behandelt bis pH 3,4 erreicht wurde. Danach wurden sofort 1 ml Antikörper (in Kopplungspuffer) auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule verschlossen und zur Kopplung der Antikörper für 2 Stunden bei RT inkubiert. Um überschüssiges, ungebundenes Antiserum und die Abgangsgruppen zu beseitigen, wurde die Säule nach der Inkubationszeit mit 3 ml Kopplungspuffer gewaschen und zur Deaktivierung der Säule zunächst 3 x mit 2 ml Puffer A und 3 x mit 2 ml Puffer B behandelt. Abschließend wurden 3 x 2 ml Puffer A auf die Säule gegeben. Die Säule wurde danach geöffnet und die sepharosegekoppelten Antikörper wurden in 2 ml PBS (1‰ Thimerosal) aufgenommen und bei 4°C gelagert.

Um ungekoppelte Sepharose für Kontrollexperimente zu erhalten, wurde eine unbehandelte HiTrap Affinitätssäule geöffnet, die Sepharose entnommen und 3 x in 2 ml PBS gewaschen. Nach einer Zentrifugation von 2 min bei 50 x g und 4°C wurde die ungekoppelte Sepharose in 2 ml PBS (1‰ Thimerosal) aufgenommen und bei 4°C gelagert.

4.5 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation isoliert prinzipiell ein bestimmtes Antigen aus einer Vielzahl von Antigenen einer Lösung. Zur Präzipitation werden immobilisierte Antikörper eingesetzt, die kovalent an eine Matrix gebunden sind. Diese immobilisierten Antikörper werden der Antigenlösung im Überschuß zugesetzt, so daß sich ein Präzipitat bildet, das neben dem Antigen auch antigenassoziierte Proteine enthalten kann.

Zur Immunpräzipitation wurden 150 µg Proteinextrakt (Abschnitt 4.1.2) pro Immunpräzipitation eingesetzt. Die Extrakte wurden zunächst auf Eis aufgetaut, auf ein Volumen von 150 µl mit Roger-Puffer (4°C) aufgefüllt und mit Benzonase behandelt. Dazu wurden den Proteinextrakten 6 Einheiten Benzonase zugegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Volumen der Extrakte auf 500 µl mit IP-Puffer (4°C) aufgefüllt, und es wurden 2,5 µl immobilisierte Antikörper (je 150 µg Proteinextrakt) zupipettiert. Die Präzipitation erfolgte über Nacht bei 4°C in 1,5 ml Reaktionsgefäßen auf einem Überkopf-Schüttler. Anschließend wurden die Präzipitate für 1 min bei 4°C und 7000 x g sedimentiert und 1 x mit 500 µl und 2 x mit 200 µl IP-Puffer gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Puffer bis auf 30 µl abgenommen und die Präzipitate wurden in 10 µl 4 x SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen. Die präzipitierten Proteine wurden für 10 min bei 95°C eluiert und zusammen mit je 75 µg unpräzipitiertem Extrakt auf 7,5 %igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen.

Zur Kontrolle der Immunpräzipitation wurden nach der Benzonasebehandlung 150 µg Proteinextrakt mit 2,5 µl ungekoppelter Sepharose über Nacht präzipitiert. Daneben wurden zur Präadsorbition der Proteinextrakte vor der Immunpräzipitation 150 µg Extrakt für 30 min mit 10 µl ungekoppelter Sepharose bei 4°C auf einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Nach der Präadsorbition wurde die ungekoppelte Sepharose für 1 min bei 4°C und 7000 x g sedimentiert, der Überstand mit 6 Einheiten Benzonase behandelt und zur Immunpräzipitation mit 2,5 µl immobilisiertem Antikörper eingesetzt. Außerdem wurden zur Kontrolle 150 µg Proteinextrakt mit 12 Einheiten Benzonase für 10 min bei RT behandelt und anschließend mit 2,5 µl immobilisiertem Antikörper präzipitiert. Die Inkubation über Nacht auf 4°C und die anschließenden Waschschrte wurden in den Kontrollexperimenten wie für die Immunpräzipitation mit immobilisierten Antikörpern angegeben durchgeführt.

4.6 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970)

Die meisten Proteine binden das Detergenz SDS über hydrophobe Wechselwirkungen zu negativ geladenen SDS-Proteinkomplexen mit konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis. SDS denaturiert dabei die Proteine und unterbindet Protein-Protein Wechselwirkungen (Quartärstrukturen). Bei der SDS-Gelelektrophorese wandert der SDS-Proteinkomplex im elektrischen Feld zum Plus-Pol. Dabei trennt der Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix die SDS-Proteinkomplexe nach ihrem Molekulargewicht auf. In einem diskontinuierlichen Puffersystem werden die SDS-Proteinkomplexe zunächst in einem großporigen Sammelgel bei niedrigem pH fokussiert. Anschließend erfolgt die Auftrennung in einem höherprozentigen Trenngel bei hohem pH.

Zur Vorbereitung der SDS-Gele wurden zwei Glasplatten (16 x 18 cm oder 10 x 8 cm, Hoefer) in eine Gießvorrichtung eingespannt. Anschließend wurde entweder ein 7,5 %iges- oder ein 8,5 %iges Trenngel (0,1 % SDS, 375 mM Tris/HCL, pH 8,8, 150 µl 10 % APS, 15 µl TEMED) gegossen und zur Bildung einer glatten Trennschicht mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation, die durch APS gestartet und durch TEMED katalysiert wird, wurde das Isopropanol entfernt und ein 5 %iges Sammelgel (0,1 % SDS, 125 mM Tris/HCl, pH 6,8, 150 µl 10 % APS, 15 µl TEMED) über das Trenngel gegossen. Ein Kamm wurde zur Bildung von Geltaschen in das Sammelgel eingesetzt. Nach vollständiger Polymerisation wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine Proteingelkammer (Hoefer) eingesetzt. Die Proteinproben wurden in 1 x SDS-PAGE Probenpuffer für 10 min bei 95°C erhitzt und mit einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen des Sammelgels aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 40 mA konstantem Stromfluß für 2-4 Stunden in 1 x SDS-PAGE Laufpuffer.

4.7 Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulosemembranen mit immunchemischem Nachweis der Proteine durch Antikörper (Westernblot) (Towbin et al., 1979)

Die in einem SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden durch das Anlegen eines elektrischen Feldes aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde eine Naßblot-Apparatur der Firma PeqLab benutzt. Zur Vorbereitung des Elektrotransfers wurden zwei

Lagen Filterpapier und eine Lage Nitrozellulosemembran auf die Größe des Gels zugeschnitten und zusammen mit zwei Transferkissen in Blot-Puffer getränkt. Anschließend wurde auf ein Transferkissen eine Lage Filterpapier gelegt. Darauf wurden in Folge das Gel, die Nitrozellulosemembran, ein weiteres Filterpapier und das zweite Transferkissen angeordnet und anschließend in eine Blot-Kassette eingelegt. Diese Kassette wurde, die Nitrozellulosemembran auf der Seite der Anode, in die Blot-Kammer eingesetzt, die Blot-Kammer wurde mit Blot-Puffer aufgefüllt, und der Proteintransfer erfolgte bei 4°C und 40 Volt für 4 Stunden. Nach dem Transfer wurde die Übertragungsrate überprüft. Dazu wurde die Membran 5 min in Ponceau S-Lösung (Sigma) inkubiert und 3 x in H₂O gewaschen. Außerdem konnte der Transfer anhand eines mitaufgetrennten, farbstoffmarkierten Proteingrößenmarkers kontrolliert werden. Die Membran wurde anschließend in PBS-t bei 4°C über Nacht gelagert.

Zum Nachweis der Proteine wurde die Membran zuerst in einer 5 %igen Milchpulver-Lösung für 1 Stunde blockiert. Die primären und sekundären Antikörper wurden in 5 % Milchpulver-Lösung verdünnt. Die Verdünnungen der einzelnen primären Antikörper betragen für IE2 (Kaninchen) 1:10000, für PE38 1:10000 (WB) bzw. 1:2000 (IP), für DBP 1:2000, für mAB5E10 (PML) 1:100 und für SUMO 1:2000. Als sekundäre Antikörper wurden HRP-gekoppelte Antikörper (horseradish peroxidase) der Firma Amersham verwendet. Für den immunchemischen Nachweis der Proteine wurden sekundäre anti-Kaninchen Antikörper 1:4000 und sekundäre anti-Maus Antikörper 1:2000 verdünnt. Nach der Blockierung wurde die Membran für 1 Stunde unter ständiger Bewegung auf einem Wipp-Tisch mit der Verdünnung des primären Antikörpers inkubiert. Anschließend wurde 3 x 10 min mit PBS-t gewaschen und die zweite Antikörperinkubation für 1 Stunde durchgeführt. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden die Proteine nachgewiesen. Dazu wurden entweder die Lösungen 1 und 2 des ECL Detektions-Kits (Amersham) in gleichem Volumenverhältnis gemischt oder die Lösungen 1 und 2 des ECLplus Detektions-Kits (Amersham) im Verhältnis 1:40 gemischt und für 1 min auf die Membran gegeben. Anschließend wurde die Membran auf einem Röntgenfilm für 30 sek bis 30 min bei RT exponiert. Der Film wurde in einer Curix 60 Entwicklermaschine der Firma Agfa entwickelt.

5. Transfektion eukaryontischer Zellen

5.1 Transfektion der Insektenzelllinie TN-368

Zur Transfektion der Insektenzelllinie wurden ca. 5×10^4 TN-368 Zellen pro Deckglas einer 6-Lochgewebekulturplatte ausgesät. Die Zellen wurden für 30 min bei RT inkubiert, mit 1 ml TC-100 Medium (+10 % FCS) überschichtet und über Nacht bei 27°C inkubiert. Zur Vorbereitung auf die Transfektion wurden die Zellen mit 2 ml Grace's Medium gewaschen. Die Transfektion der Insektenzellen erfolgte mit DNA-Liposomenkomplexen unter Verwendung des Transfektionsreagenz Lipofectamin (GibcoBRL). Dazu wurden zunächst in 5 ml Polystyrenröhrchen DNA-Lösungen und Liposomen-Lösungen in Grace's Medium hergestellt. Zunächst wurden 1-2 µg DNA mit je 10 µl PLUS-Reagenz (GibcoBRL) pro µg DNA in 100 µl Grace's Medium für 15 min komplexiert (Lösung A). In der Zwischenzeit wurden 2 µl Lipofectamin in 100 µl Grace's Medium verdünnt (Lösung B). Anschließend wurde die Lösung A in die Lösung B pipettiert, die Lösungen gemischt und für 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die DNA-Liposomenkomplexe mit 800 µl Grace's Medium aufgefüllt und auf gewaschene TN-368 Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 5 Stunden bei 27°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die DNA-Liposomenkomplexe abgenommen und die Zellen für weitere 43 Stunden bei 27°C in TC-100 (+10 % FCS) inkubiert. Die Fixierung der Zellen in 2 % Paraformaldehyd erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion.

5.2 Transfektion der Säugerzelllinien HeLa und BHK21

Zur Transfektion der Säugerzellen wurden sowohl DNA-Calciumpräzipitate als auch DNA-Liposomenkomplexe verwendet.

HeLa Zellen (ca. 5×10^6 Zellen) wurden 12-16 Stunden vor der Transfektion in Gewebekulturflaschen (75 cm²) verdünnt und mit DNA-Calciumpräzipitaten transfiziert. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Medium der Zellen durch 10 ml frisches Dulbecco's Medium (+10 % FCS) ersetzt. Pro Gewebekulturflasche (75 cm²) wurden 35 µg Plasmid DNA transfiziert. Zur Herstellung der DNA-Calciumpräzipitate wurde die DNA auf 616 µl mit H₂O aufgefüllt und 84 µl 2 M CaCl₂ zugegeben. Dieses Gemisch wurde tropfenweise in 700 µl 2 x HBS-Puffer (pH 7,17) pipettiert und für 30 min auf 37°C inkubiert. Während der Inkubation bildeten sich die DNA-Calciumkomplexe aus und wurden

anschließend auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ wurden die Präzipitate abgenommen und durch frisches Dulbecco's Medium (+10 % FCS) ersetzt. Die auf Detergenz basierende Zellfraktionierung der transfizierten HeLa Zellen erfolgte 45 Stunden nach der Transfektion.

BHK21 Zellen wurden auf 20 x 20 mm Deckgläsern ausgesät (3-5 x 10⁴ pro Deckglas) und entweder mit DNA-Calciumpräzipitaten oder DNA-Liposomenkomplexen transfiziert.

Zur Transfektion mit DNA-Calciumpräzipitaten wurden die Zellen 12-16 Stunden vor der Transfektion ausgesät und anschließend mit je 5 µg Plasmid DNA transfiziert. Zur Herstellung der DNA-Calciumkomplexe wurde die Plasmid DNA ähnlich der HeLa-Transfektion auf 176 µl mit H₂O aufgefüllt und 24 µl 2 M CaCl₂ zugegeben. Anschließend wurde diese Lösung in 200 µl 2 x HBS-Puffer (pH 7,17) pipettiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Präzipitate wurden auf die Zellen (in 1 ml frischem Dulbeccos's Medium (+10 % FCS)) gegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion in 2 % Paraformaldehyd fixiert.

Die Transfektion der BHK21 Zellen mit DNA-Liposomenkomplexen verlief analog zur Lipofectamintransfektion der TN-368 Zellen. Im Vergleich zur Transfektion der Insektenzellen wurde anstelle von Grace's Medium das Medium Optimem (GibcoBRL) eingesetzt und pro µg DNA wurden 6 µl Lipofectamin eingesetzt. Auf den Zusatz des PLUS-Reagenz wurde bei der Verdünnung der DNA verzichtet. BHK21 Zellen wurden mit 1-2 µg Plasmid DNA transfiziert und 48 Stunden nach der Transfektion in 2 % Paraformaldehyd fixiert.

6. Indirekte Immunfluoreszenz

(Harlow und Lane, 1988)

In indirekten Immunfluoreszenzstudien werden Antikörper nicht nur zum Nachweis von Antigenen, sondern im Besonderen zum Nachweis der subzellulären Lokalisierung dieser Antigene verwendet. Dadurch können neue Einblicke in die charakteristischen Eigenschaften der Antigene gewonnen werden. Prinzipiell werden bei indirekten Immunfluoreszenzstudien Zellen, die das zu untersuchende Antigen exprimieren, zuerst fixiert, permeabilisiert und zum

Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen mit Proteinlösung behandelt. Anschließend folgt die Inkubation mit einem primären Antikörper, der gegen das zu untersuchende Antigen gerichtet ist. Danach wird das Antigen über einen sekundären fluorochromgekoppelten Antikörper nachgewiesen. Dieser Antikörper richtet sich gegen ein Epitop des primären Antikörpers und sein Fluorochrom emittiert nach Bestrahlung mit Fluoreszenzlicht Licht einer bestimmten Wellenlänge, das mit einem Immunfluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden kann.

6.1 Zellpräparation

Zur Durchführung von indirekten Immunfluoreszenzstudien wurden Zellen auf 20 x 20 mm Deckgläsern ausgesät. Dazu wurden die Deckgläser zunächst zur Sterilisation in 96 %igen Alkohol (EtOH) getaucht und über einer Bunsenbrennerflamme abgeflammt. TN-368 Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^4 Zellen pro Deckglas und BHK21 Zellen in einer Dichte von $3-5 \times 10^4$ Zellen pro Deckglas ausgesät. Anschließend wurden die TN-368 Zellen infiziert (Abschnitt 2.3), transfiziert (Abschnitt 5.1), mit BrdU markiert (Abschnitt 1.7) oder es wurden unbehandelte Zellen betrachtet. BHK21 Zellen wurden für Immunfluoreszenzstudien transfiziert (Abschnitt 5.2) oder es wurden unbehandelte Zellen analysiert.

6.2 Fixierung der Zellen

Die Fixierung sollte nach Möglichkeit das Antigen immobilisieren und dabei die Struktur und die subzelluläre Lokalisierung des Antigens nicht verändern. Nach der Fixierung sollte die zelluläre Architektur erhalten bleiben und die Antikörper dennoch Zugang zu den zellulären Kompartimenten haben. Eine ideale Fixierungsmethode existiert aber nicht. Manche Epitope werden bei der Fixierung maskiert oder durch das Fixierungsgagens verändert. Daher wurden in dieser Arbeit verschiedene Fixierungsmethoden verwendet, denen unterschiedliche Prinzipien zugrunde liegen.

6.2.1 Fixierung durch Präzipitation (Aceton-Fixierung)

Aceton ist ein organisches Lösungsmittel, das zur Fixierung von Zellen verwendet wird. Es entzieht den Zellen das Wasser, indem es die Lipide der Zelle entfernt. Dadurch werden die Proteine präzipitiert und die Architektur der Zelle bleibt weitgehend erhalten. Nach der

Aceton-Fixierung müssen die Präparate zur anschließenden Antikörperbindung nicht permeabilisiert werden.

Vor der Fixierung wurden die Zellen 3 x in PBS gewaschen und anschließend in 100 % Aceton, das zuvor auf -20°C abgekühlt wurde, für 15 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen für 15 min bei RT getrocknet und konnten entweder für einige Tage bei -20°C gelagert oder sofort mit Antikörpern untersucht werden.

6.2.2 Fixierung durch Vernetzung (Paraformaldehyd-Fixierung)

Paraformaldehyd fixiert die Zellen, indem es intramolekulare Brücken zwischen freien Aminogruppen der Proteine ausbildet und damit ein Netzwerk zwischen den Antigenen aufbaut. Im Vergleich zur Aceton-Fixierung ist die Paraformaldehyd-Fixierung schonender für die Zellarchitektur und läßt dabei die Membranen der Zellen intakt.

Zellen wurden vor der Paraformaldehyd-Fixierung 3 x in PBS gewaschen und anschließend für 15 min in einer 2 %igen Paraformaldehyd-Lösung inkubiert. Nach der Fixierung wurde nochmals mit PBS gewaschen und die Präparate konnten über Nacht bei 4°C in PBS gelagert werden. Paraformaldehyd zeigt unter dem Fluoreszenzmikroskop Eigenfluoreszenz. Deshalb wurden die Zellen im Anschluß an die Fixierung für 10 min mit einer 0,1 M Glycin-Lösung bei RT behandelt. Da nach der Fixierung mit Paraformaldehyd die Zellmembranen intakt blieben, wurden die Membranen mit einer 0,1 %igen Triton-X-100-Lösung für 15 min bei RT permeabilisiert. Danach wurden die Zellen erneut in PBS gewaschen.

6.3 Denaturierung der DNA nach Markierung mit BrdU

Im Gegensatz zu allen anderen Zellpräparaten wurden BrdU markierte Zellen (Abschnitt 1.7) nach der Paraformaldehyd-Fixierung und der Permeabilisierung durch Triton-X-100 zur Denaturierung der DNA für 2 min mit 0,07 M NaOH behandelt. Anschließend wurden die Zellen 3 x für 2 min in PBS gewaschen.

6.4 Antikörperbindung

Die Zellpräparate wurden zum Blockieren unspezifischer Antikörperbindungen für 30 min in 2 ml einer 2 %igen BSA-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Präparate für 1 Stunde bei RT mit einer verdünnten Lösung des primären Antikörpers behandelt. Dabei wurden

jeweils 40 µl Antikörperverdünnung pro Deckglas verwendet. Die Antikörper wurden wie folgt in 2 %iger BSA-Lösung verdünnt und anschließend zum Präzipitieren von Aggregaten für 30 min bei 22000 x g und 4°C zentrifugiert:

IE2 Antiserum (Kaninchen)	1:1000
PE38 Antiserum (Kaninchen)	1:1000
IE2 Antiserum (Maus)	1:100
DBP Antiserum (Kaninchen)	1:4000
LEF-3 Antiserum (Kaninchen)	1:100
PML Antiserum (Kaninchen)	1:500
PML Antikörper mAB5E10 (Maus)	1:10
BrdU Antikörper (Maus)	1:50
SUMO Antiserum (Kaninchen)	1:200

Zum Entfernen ungebundener Antikörper wurden die Zellen 3 x in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte der Nachweis der Antigene durch eine 30-minütige Inkubation mit 40 µl fluorochromgekoppelten sekundären Antikörpern. Wegen der Lichtempfindlichkeit der Fluorochrome erfolgte dieser Inkubationsschritt im Dunkeln. Die sekundären Antikörper wurden wie die Primäantikörper in 2 %iger BSA-Lösung verdünnt und anschließend abzentrifugiert. Die Verdünnungen der primären und sekundären Antikörper wurden in Verdünnungsreihen auf optimale Fluoreszenzsignale getestet:

FITC-gekoppelter anti-Kaninchen Antikörper	1:1000
FITC-gekoppelter anti-Maus Antikörper	1:1000
Cy3-gekoppelter anti-Kaninchen Antikörper	1:2000-1:4000
Cy3-gekoppelte anti-Maus Antikörper	1:2000-1:4000

Das Fluorochrom FITC (Fluoresceinisothiocyanat) emittiert bei Anregung mit blauem Licht eine grüne Fluoreszenz, während das Fluorochrom Cy3 bei Anregung mit gelb-grünem Licht eine rote Fluoreszenz abstrahlt. Um ungebundene sekundäre Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen nach der Inkubation mit sekundärem Antikörper 3 x in PBS gewaschen,.

6.5 Doppelfärbungen

Mit der Technik der indirekten Immunfluoreszenz können durch Doppelfärbungen die subzellulären Lokalisierungen von zwei verschiedenen Antigenen simultan nachgewiesen werden. Dabei kann die Lokalisierung des einen Antigens in Relation zur Lokalisierung des anderen Antigens betrachtet werden.

Wichtig für die Doppelfärbung ist, daß die beiden Antigene von zwei verschiedenen fluorochromgekoppelten Antikörpern nachgewiesen werden. Ein einfacher Weg diese Voraussetzung zu erfüllen, ist die Verwendung von primären Antikörpern aus verschiedenen Spezies. Mit Hilfe von sekundären Antikörpern, die speziesspezifisch die primären

Antikörper erkennen und verschiedene Fluorochrome tragen, kann das eine Antigen vom anderen unterschieden werden. In dieser Arbeit wurden die folgenden primären und sekundären Antikörperkombinationen verwendet:

α -IE2 (Maus) + α -PE38 (Kaninchen) / Cy3 (α -Maus) + FITC (α -Kaninchen)
 α -IE2 (Kaninchen) + α -PML (Maus) / Cy3 (α -Kaninchen) + FITC (α -Maus)
 α -PE38 (Kaninchen) + α -PML (Maus) / Cy3 (α -Kaninchen) + FITC (α -Maus)
 α -IE2 (Kaninchen) + α -PML (Maus) / Cy3 (α -Maus) + FITC (α -Kaninchen)
 α -PE38 (Kaninchen) + α -PML (Maus) / Cy3 (α -Maus) + FITC (α -Kaninchen)
 α -IE2 (Maus) + α -LEF-3 (Kaninchen) / Cy3 (α -Maus) + FITC (α -Kaninchen)
 α -IE2 (Maus) + α -DBP (Kaninchen) / Cy3 (α -Maus) + FITC (α -Kaninchen)
 α -IE2 (Kaninchen) + α -BrdU (Maus) / Cy3 (α -Maus) + FITC (α -Kaninchen)
 α -DBP (Kaninchen) + α -BrdU (Maus) / Cy3 (α -Maus) + FITC (α -Kaninchen)
 α -PML (Kaninchen) + α -BrdU (Maus) / Cy3 (α -Maus) + FITC (α -Kaninchen)
 α -IE2 (Maus) + α -SUMO (Kaninchen) / Cy3 (α -Kaninchen) + FITC (α -Maus)
 α -PML (Maus) + α -SUMO (Kaninchen) / Cy3 (α -Kaninchen) + FITC (α -Maus)

Doppelfärbungen mit zwei verschiedenen primären und sekundären Antikörpern erfolgten unter den gleichen Bedingungen wie unter dem Abschnitt Antikörperbindung angegeben. Während den Antikörperinkubationen enthielten die Antikörperverdünnungen in 40 μ l Volumen beide verwendeten Antikörper in den oben aufgelisteten Konzentrationen.

6.6 Fluoreszenzmikroskopie

Nach der Behandlung der Zellen mit Antikörpern wurden die Präparate in Einbettmedium eingebettet. Als Antibleichmittel wurde das Reagenz DABCO, das ein frühzeitiges Ausbleichen der Fluorochrome durch Lichteinstrahlung verhindert, verwendet. Es wurde ein Tropfen Einbettmedium pro Deckglas auf einen Objektträger pipettiert. Anschließend wurde das Deckglas mit den Zellen auf der Unterseite auf den Tropfen gelegt und mit Nagellack auf dem Objektträger fixiert. Bis zur Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop oder an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskopsystem wurden die Zellen bei 4°C in Dunkelheit gelagert.

Die Auswertung der Präparate erfolgte mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopen des Typs Olympus BH2-RFC mit einer Olympus SC-35 Kamera und Kodak Ektachrom 400HC Filmen oder mit einem Zeiss Axiovert 135 Mikroskop mit einem digitalen Intas ORCA Kamerasystem III oder einer Contax 167MT-Kamera mit Kodak Ektachrom 400HC Filmen bei konstanten Belichtungszeiten. Zur konfokalen Analyse wurde sowohl das LSM4 Mikroskopsystem der Firma Zeiss mit Zeiss Software als auch ein konfokales Mikroskopsystem der Firma Leica verwendet. Das Leica Mikroskopsystem bestand aus einem

DM IRBE Fluoreszenzmikroskop, das mit einer Leica TCS-SP Detektoreinheit verbunden war.

IV. Ergebnisse

Die molekulare Rolle der beiden baculoviralen Proteine IE2 und PE38 ist trotz zahlreicher Hinweise auf potentielle IE2 und PE38 Funktionen bisher unklar. Als Basis zur Charakterisierung potentieller IE2 und PE38 Funktionen wurde in dieser Arbeit die subzelluläre Lokalisierung von IE2 und PE38 betrachtet. Frühere Studien zeigten, daß sowohl IE2 als auch PE38 in der frühen Phase der Infektion im Zellkern exprimiert werden und in transfizierten Zellen in distinkten Kerndomänen lokalisieren (Krappa et al. 1995). Im folgenden wird zur Funktionsanalyse von IE2 und PE38 ihre Assoziation mit zellulären und viralen Faktoren funktioneller Kerndomänen mit Hilfe von Immunfluoreszenzstudien und Immunpräzipitationsexperimenten untersucht.

1. Kernlokalisierung von IE2 und PE38 im Infektionsverlauf

Als Ausgangspunkt für die Funktionsanalyse wurde die Lokalisierung von IE2 und PE38 im Infektionsverlauf untersucht. Dazu wurde die permissive Zelllinie TN-368 mit AcMNPV Virus infiziert, und infizierte und uninfizierte Zellen wurden anhand von Immunfluoreszenzstudien untersucht (Abb. 2 A, B).

Sowohl für IE2 als auch für PE38 zeigten uninfizierte Zellen nach der Inkubation mit polyklonalem IE2 oder PE38 Antiserum kein spezifisches Signal (Abb. 2 A a, B a). IE2 lokalisierte in infizierten Zellen in nukleären Domänen, die sich homogen im Kern verteilten (Abb. 2 A b-d). Im Infektionsverlauf wurden IE2 Domänen ab 2 h p.i. nachgewiesen und zeigten keine signifikante Veränderung bis 8 h p.i. Ab 16 h p.i. veränderte sich die IE2 Lokalisierung zu fadenförmigen Strukturen, die auch 24 h p.i. noch nachgewiesen wurde (Abb. 2 A e, f). Die Anzahl fadenförmiger Strukturen im Vergleich zur Anzahl nukleärer Domänen war im späteren Infektionsverlauf drastisch reduziert.

Im Gegensatz zu IE2 lokalisierte PE38 nur teilweise in nukleären Domänen. Die Mehrheit der infizierten Zellen zeigte PE38 in granulären Strukturen im Kern (Abb. 2 B b-d). Die Expression von PE38 wurde ab 2 h p.i. bis 8 h p.i. nachgewiesen, dabei traten nukleäre Domänen überwiegend 2 h p.i. auf (Abb. 2 B b). In der späten Phase der Infektion 16 und

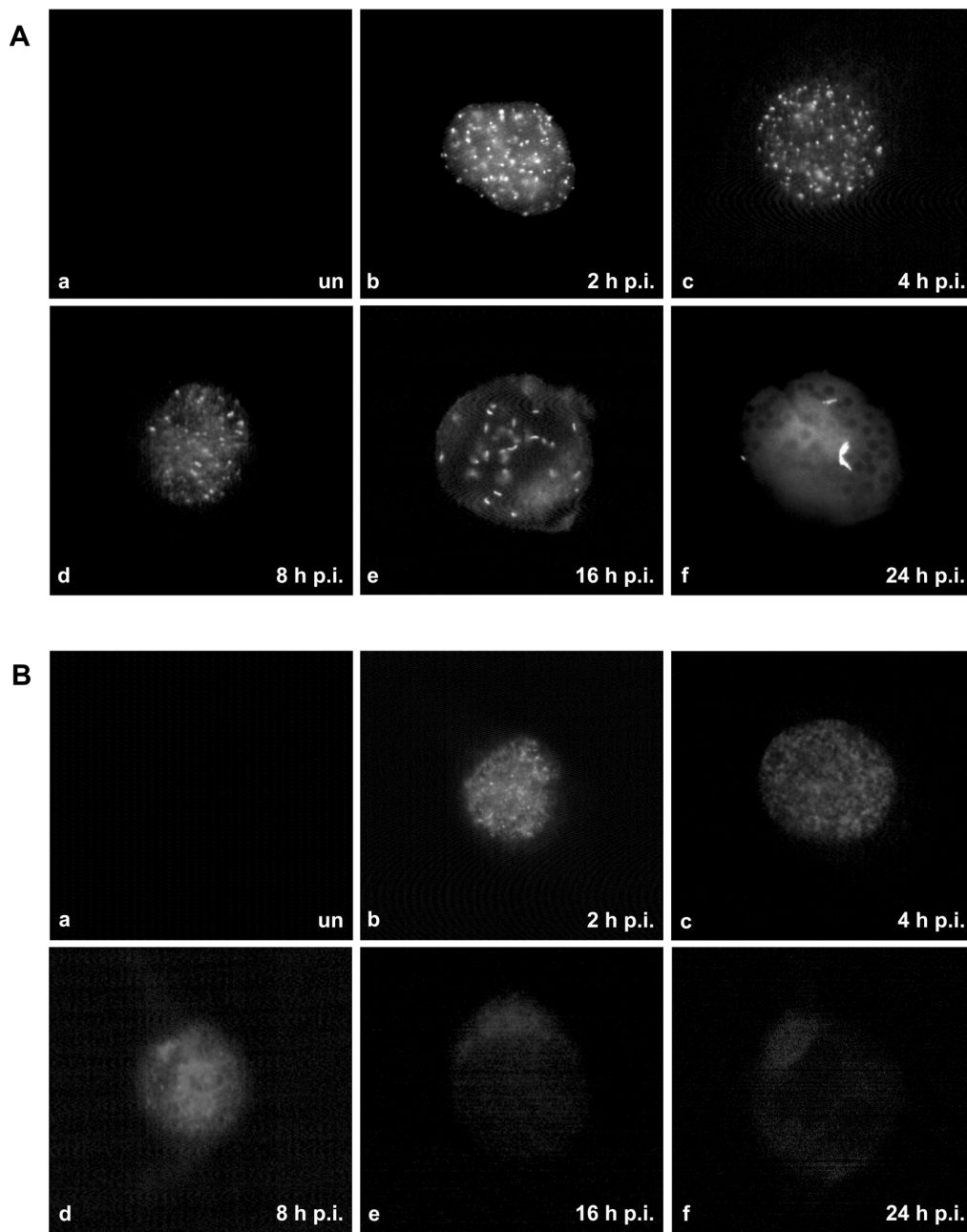


Abb. 2: Analyse der IE2 und PE38 Lokalisierung im Infektionsverlauf (Quadt, 2000)

TN-368 Zellen wurden mit wt AcMNPV Virus infiziert und uninfizierte (a) und infizierte Zellen wurden 2, 4, 8, 16 und 24 h p.i. (b, c, d, e, f) in Aceton fixiert. IE2 wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit polyklonalem anti-IE2 Kaninchenserum (A) und PE38 mit polyklonalem anti-PE38 Kaninchenserum (B) nachgewiesen. Dabei wurden IE2 und PE38 mit FITC-gekoppelten Antikörpern sichtbar gemacht. Die schwache PE38 Färbung 16 und 24 h p.i. (B e, f) wurde als unspezifisch bewertet, da sie auch in Zellen, die entweder nur mit Präimmenserum oder nur mit sekundärem Antikörper inkubiert wurden, nachzuweisen war.

24 h p.i. konnte kein spezifisches PE38 Signal erkannt werden (Abb. 2 B e, f).

Diese Studien zeigten in der frühen Phase der Infektion ähnlich wie in Transfektionsstudien die Lokalisierung von IE2 in nukleären Domänen, während PE38 nur 2 h p.i. in nukleären Domänen lokalisierte und hauptsächlich granuläre Strukturen ausbildete.

2. Kolokalisierung von IE2 und PE38 in Kerndomänen 2 h p.i.

Die Beobachtung, daß sowohl IE2 als auch PE38 zu Beginn ihrer Expression mit nukleären Domänen assoziieren, führte zu der Hypothese, daß IE2 und PE38 zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Infektion in gemeinsamen Kerndomänen lokalisieren. Distinkte PE38 Kerndomänen konnten später als 2 h p.i. nicht mehr nachgewiesen werden, während IE2 weiterhin in Kernstrukturen lokalisierte. PE38 könnte daher in der frühen Phase der Infektion aus gemeinsamen IE2/PE38 Kerndomänen entlassen werden.

Um diese Hypothese zu testen, wurden infizierte TN-368 Zellen 2 und 4 h p.i. mit polyklonalen Antiseren gegen IE2 und PE38 parallel angefärbt. Das Augenmerk lag auf Zellen in der frühen Phase der Infektion, die sowohl IE2 als auch PE38 in nukleären Domänen zeigten. Dabei überschritt die Anzahl an IE2 Domänen immer die Anzahl an PE38 Domänen (Abb. 3). Die konfokale mikroskopische Analyse infizierter Zellen zeigte 2 h p.i. überlappende IE2 und PE38 Signale, die auf eine gemeinsame Lokalisierung von IE2 und PE38 in Kernstrukturen hinwiesen (Abb. 3). Dagegen konnte 4 h p.i. keine signifikante Kolokalisierung von IE2 und PE38 gezeigt werden. Möglicherweise wurde PE38 bereits aus den gemeinsamen Domänen freigesetzt, denn das Verhältnis IE2 Domänen zu PE38 Domänen verschob sich 4 h p.i. noch stärker in Richtung IE2, nur selten wurden PE38 Domänen nachgewiesen.

Diese Studie zeigte die Kolokalisierung von IE2 und PE38 2 Stunden nach Beginn der Infektion. Zu diesem Zeitpunkt war PE38 neben der Lokalisierung in granulären Strukturen am häufigsten in distinkten Kernstrukturen nachweisbar.

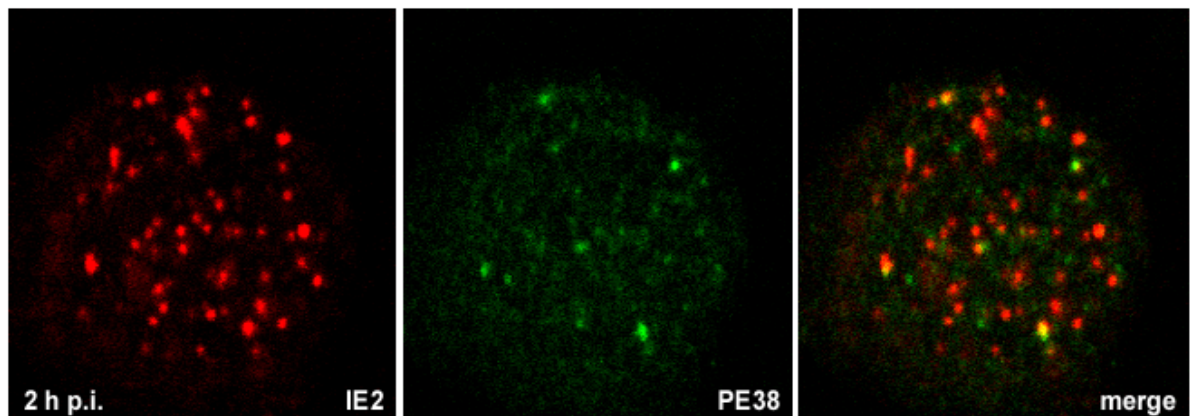


Abb. 3: Kolokalisierung von IE2 und PE38 2 h p.i.

TN-368 Zellen wurden mit wt AcMNPV Virus infiziert und in Aceton fixiert. Zum Nachweis von IE2 durch indirekte Immunfluoreszenz wurde polyklonales anti-IE2 Mausserum und zum Nachweis von PE38 polyklonales anti-PE38 Kaninchenserum verwendet. Dabei wurde IE2 durch Cy3-gekoppelte Antikörper (rot) und PE38 durch FITC-gekoppelte Antikörper (grün) sichtbar gemacht. Die Überlagerung der Signale einer Zelle ist rechts dargestellt. Dabei zeigen gelbe Signale Kolokalisierung an. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskopsystems der Firma Leica angefertigt.

3. Expression und Lokalisierung des humanen PML Proteins in Insektenzellen

Für die weiteren Untersuchungen stellte sich die Frage, ob die frühen Genprodukte IE2 und PE38 in funktionellen Kernstrukturen lokalisieren. Um diese Assoziation mit funktionellen Kernstrukturen zu überprüfen, können sowohl virale als auch zelluläre Proteine, die in distinkten Kernstrukturen lokalisieren, als Marker für funktionelle Kerndomänen dienen. Ein Beispiel für die Interaktion früher Proteine anderer DNA Viren mit funktionellen nukleären Domänen im Infektionsverlauf sind die PODs des Zellkerns. Um aufzuklären, ob IE2 oder PE38 ein ähnliches Potential besitzen, wurde zuerst die Existenz von POD ähnlichen Strukturen in Insektenzellen überprüft. Dazu wurden Antikörper gegen das humane PML Protein, der am besten charakterisierten Komponente der PODs, in den Insektenzelllinien TN-368 und *S. frugiperda* getestet. Immunfluoreszenzstudien, die sowohl mit einem monoklonalen Antikörper gegen PML (Stuurman et al., 1992) als auch mit einem polyklonalen Antiserum gegen PML (Weis et al., 1994) durchgeführt wurden, erkannten kein konserviertes Antigen in Insektenzellen.

Um erste Hinweise auf eine funktionelle Konservierung von PODs in Insektenzellen zu erhalten, wurde eine charakterisierte Variante des humanen PML Proteins in Insektenzellen transfiziert (de The et al., 1991). Dazu wurde das humane pml Gen unter die Kontrolle des pe38 Promotors kloniert. Dieses Konstrukt pe38PML-HR1 enthält zusätzlich eine Insertion der homologen Region hr1, die die Expression des pe38 Promotors verstärkt (Krappa et al., 1995). Nach der Transfektion dieses Konstrukts in TN-368 Zellen, konnte durch Anfärben der Zellen mit monoklonalem PML Antikörper die Lokalisierung von PML in Kerndomänen auf leicht diffusem Hintergrund nachgewiesen werden (Abb. 4 A). Wie endogene PML Domänen, z. B. die der Säugerzelllinie BHK21 (Abb. 4 B), zeigten die transient exprimierte PML Domänen eine homogene Verteilung über den gesamten Zellkern. Einziger Unterschied war die Größe und die Anzahl der Domänen. In transfizierten Insektenzellen hatten PML markierte Domänen mehr Volumen als adäquate Domänen in Säugerzellen, außerdem war ihre Anzahl in Insektenzellen gegenüber BHK21 Zellen reduziert. Diese Unterschiede überraschten nicht, da eine Heterogenität der PODs auch zwischen Säugerzelllinien beschrieben wurde (Ascoli und Maul, 1991; Stuurman et al., 1992).

Diese Studien zeigten, daß heterolog exprimiertes humanes PML in Insektenzellen ähnlich wie in Säugerzellen mit Kernstrukturen assoziiert.

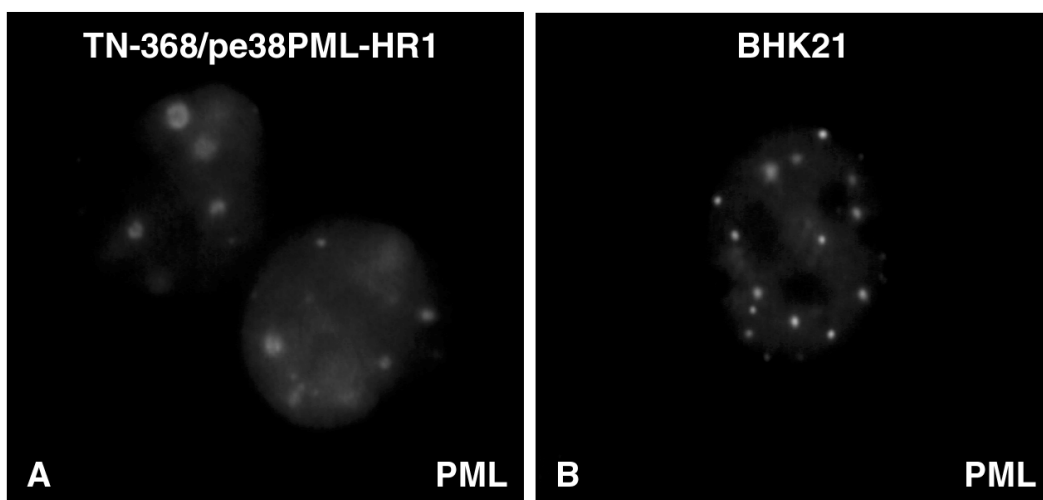


Abb. 4: Lokalisierung von heterolog exprimiertem PML in TN-368 Zellen und endogenem PML in BHK21 Zellen

TN-368 Zellen wurden mit dem Plasmid pe38PML-HR1 transfiziert und 48 Stunden nach der Transfektion in 2% Paraformaldehyd fixiert (A). Bei der Liposomentransfektion wurde 1 μ g Plasmid DNA pro 5×10^4 Zellen eingesetzt. Daneben wurden untransfizierte BHK21 Zellen auf Deckgläsern ausgesät und in 2% Paraformaldehyd fixiert (B). PML wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit mAB5E10 und FITC-gekoppelten Antikörpern nachgewiesen.

3.1 Herstellung rekombinanter Baculoviren zur Expression von PML in Insektenzellen

Nachdem gezeigt werden konnte, daß PML auch in Insektenzellen mit Kerndomänen assoziiert und damit potentielle insektenspezifische PODs markiert, stellte sich die Frage, ob IE2 oder PE38 im Infektionsverlauf mit PML Domänen kolokalisieren oder interagieren. Dazu wurden rekombinante Baculoviren hergestellt, die PML unter der Kontrolle des frühen pe38 Promotors exprimieren und dadurch eine zeitgleiche Expression von IE2, PE38 und PML gewährleisten sollen.

Rekombinante Baculoviren wurden durch homologe Rekombination hergestellt. Dazu wurden *S. frugiperda* Zellen gleichzeitig mit viraler DNA und einem Transfervektor, der nicht-virale fremde DNA enthielt, transfiziert. Damit Rekombination in den transfizierten Zellen stattfinden konnte, flankierten Sequenzen homolog zur Insertionsstelle des Virusgenoms die fremde DNA. Eine homologe Rekombination zwischen Virusgenom und Transfervektor findet mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 1% statt (Martens et al., 1995). Das rekombinante Virus wurde anschließend vom Ausgangsvirus mit Hilfe eines Markergens getrennt. Es befand sich entweder auf dem Virusgenom und wurde durch die Rekombination deletiert oder auf dem Transfervektor und wurde zusammen mit der fremden DNA in das Virusgenom inseriert. Als Markergen diente das lacZ Gen aus *E. coli*, um mit Hilfe der blau/weiß Selektion rekombinante Viren von Ausgangsviren zu trennen.

Zur Herstellung von PML exprimierenden Baculoviren wurden zwei Strategien verfolgt. Schematische Darstellungen der Rekombination zur Herstellung von AcMNPV-PML/l und AcMNPV-PML/e zeigen die Abbildungen 5 und 6.

3.1.1 Herstellung von AcMNPV-PML/l

Als virale DNA zur Herstellung von AcMNPV-PML/l diente das Genom des rekombinanten Virus AcMNPV/PE38, das eine Insertion einer pe38 Promotor lacZ Genkassette (pe38/lacZ Kasette) in der polyhedrin Genregion trägt (Knebel-Mörsdorf et al., 1996). Plaques dieser Rekombinanten, die sich nach der Infektion einzelner Viren im Zellkulturrasen bildeten, wurden durch Inkubation mit X-Gal blau gefärbt. Der Transfervektor pUC-PE38PML enthielt eine pe38 Promotor pml Genkassette (pe38/pml Kasette) umgeben von flankierenden

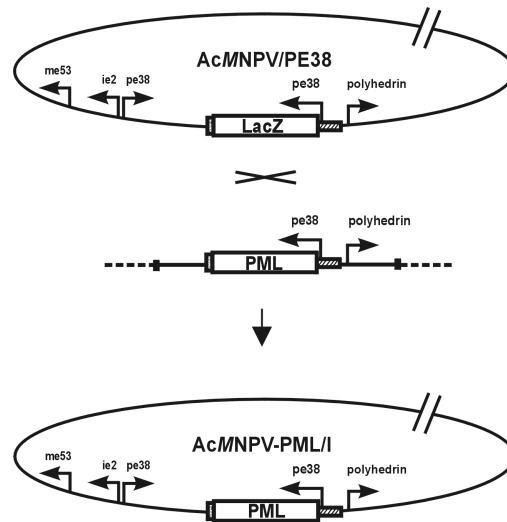


Abb. 5: Schematische Darstellung der Rekombination zur Herstellung von AcMNPV-PML/I

Das Virus AcMNPV-PML/I wurde hergestellt durch homologe Rekombination zwischen dem Transfervektor pUC-PE38PML, der eine pe38/pml Genkassette stromaufwärts des polyhedrin Gens enthält und viraler DNA des rekombinanten Virus AcMNPV/PE38. Die pe38/pml Genkassette enthält das SV40 Terminationssignal der Transkription. Die Pfeile zeigen die transkriptionellen Startpunkte der viralen Gene und der eingefügten Genkassetten an.

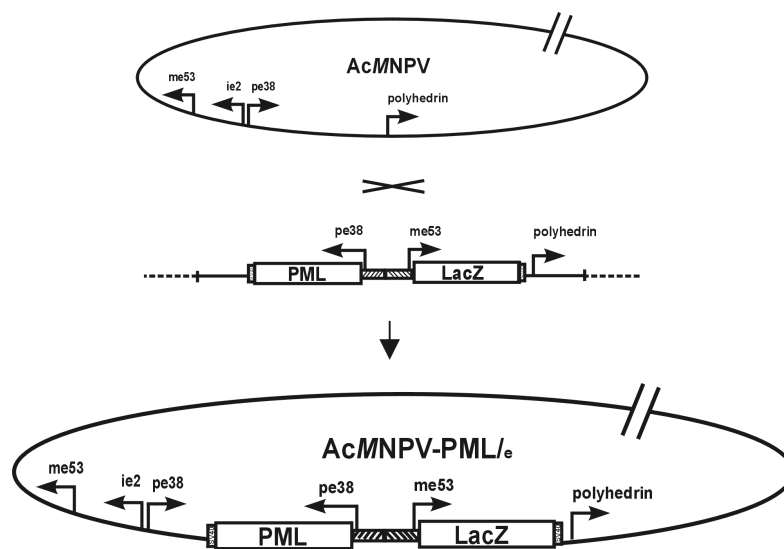


Abb. 6: Schematische Darstellung der Rekombination zur Herstellung von AcMNPV-PML/e

Das Virus AcMNPV-PML/e wurde hergestellt durch homologe Rekombination zwischen dem Transfervektor pUC-ME53LacZ/PE38PML, der neben der pe38/pml Genkassette eine me53/lacZ Markergenkassette stromaufwärts des polyhedrin Gens enthält und wt AcMNPV DNA. Die Markergenkassette liegt Kopf an Kopf in entgegengesetzter Richtung zur pe38/PML Kassette auf dem Transfervektor. Dabei enthalten beide Kassetten das SV40 Terminationssignal der Transkription. Die Pfeile zeigen die transkriptionellen Startpunkte der viralen Gene und der eingefügten Genkassetten an.

Sequenzen homolog zur polyhedrin Genregion. Nach erfolgreicher Rekombination ersetzte die pe38/pml Kasette des Transfervektors die pe38/lacZ Kasette des Ausgangsvirus. Die Plaques des neuen Virus AcMNPV-PML/l konnten durch Inkubation mit X-Gal nicht gefärbt werden. Durch eine Selektion auf weiße Plaques wurde die neue Rekombinante von den Ausgangsviren isoliert. Das rekombinante Virus trug die Insertion der pe38/pml Kasette stromaufwärts der polyhedrin Promotorregion. Der pe38 Promotor, der die Expression des pml Gens regulierte, lag relativ zum endogenen pe38 Promotor in entgegengesetzter Richtung auf dem Virusgenom. Ein rekombinantes Virus mit dupliziertem pe38 Promotor, das endogenen Promotor und Duplikat in genomischer Orientierung enthielt, konnte nicht isoliert werden. Möglicherweise trat bei diesen rekombinanten Viren eine erhöhte Rekombinationsfrequenz und dadurch bedingt eine genomische Instabilität auf (Knebel-Mörsdorf, persönliche Mitteilung).

3.1.2 Herstellung von AcMNPV-PML/e

Der Transfervektor pUC-ME53LacZ/PE38PML, der zur Herstellung von AcMNPV-PML/e benutzt wurde, enthielt neben der pe38/pml Kasette zusätzlich eine me53 Promotor lacZ Markergenkasette. Die Markergenkasette lag Kopf an Kopf in entgegengesetzter Richtung zur pe38/pml Kasette auf dem Transfervektor. Die beiden Kassetten wurden von Sequenzen homolog zur polyhedrin Genregion flankiert. Zur Rekombination wurde der Transfervektor zusammen mit wt AcMNPV DNA in *S. frugiperda* Zellen transfiziert. Dadurch ereignete sich stromaufwärts des polyhedrin Gens die Insertion der pe38/pml Kasette zusammen mit der Markergenkasette in das Virusgenom. Mit Hilfe der LacZ Expression der Markergenkasette wurde das neue Virus gereinigt. Wie bei AcMNPV-PML/l lag der pe38 Promotor, der die Expression des pml Gens regulierte, relativ zum endogenen pe38 Promotor in entgegengesetzter Richtung auf dem Virusgenom.

3.2 Analyse der PML Expression nach Infektion mit AcMNPV-PML/l und nach Infektion mit AcMNPV-PML/e

Die PML Expression der beiden PML Virusrekombinanten wurde unter Kontrolle des frühen pe38 Promotors gestellt, damit die PML Expression zeitgleich mit der Expression von IE2 und PE38 einherging. Um zu prüfen, ob das PML Expressionsmuster tatsächlich das von PE38 widerspiegelte, wurde die Expression von PML auf Proteinebene untersucht. Dazu

wurden nukleäre Fraktionen infizierter Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion mit Hilfe der Westernblot Technik analysiert.

Die Zelllinie TN-368 wurde mit *AcMNPV-PML/1* bzw. *AcMNPV-PML/e* infiziert und Kernextrakte aus uninfizierten und aus Zellen nach 2, 4, 8, 12, 16 und 24 h p.i. präpariert. Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers gegen PML konnte ein ca. 90 kDa großes Protein in diesen Kernextrakten nachgewiesen werden (Mu et al., 1994; Sternsdorf et al., 1997b). Zur Kontrolle der PML Signalspezifität wurde die nukleäre Fraktion transfizierter HeLa Zellen, die die PML Isoform der Virusrekombinanten exprimierten, untersucht. Das viral exprimierte PML Protein und das transient exprimierte PML Protein der HeLa Zellen korrelierten im Bezug auf ihr Molekulargewicht (Abb. 7, 8). Uninfizierte Insektenzellen zeigten dagegen kein PML Signal (Abb. 7, 8). In *AcMNPV-PML/1* infizierten Zellen wurde die PML Expression ab 8 h p.i. nachgewiesen, nahm 16 h p.i. stark zu und erreichte 24 h p.i. eine noch stärkere Intensität (Abb. 7).

Der Beginn der PML Expression von *AcMNPV-PML/e* setzte im Vergleich zu *AcMNPV-PML/1* früher ein. PML Expression konnte ab 4 h p.i. nachgewiesen werden und erreichte ihren Höhepunkt 16 h p.i. (Abb. 8). In der Zwischenzeit konnte ein stetiger Anstieg der PML Expression beobachtet werden. Im Vergleich zu 16 h p.i. nahm die Expression von PML 24 h p.i. leicht ab (Abb. 8). Die Expression von PE38 und IE2 konnte dagegen wie erwartet in der *AcMNPV-PML/e* Expressionskaskade ab 2 h p.i. nachgewiesen werden (Abb. 8).

Sowohl die Rekombinante *AcMNPV-PML/1* als auch die Rekombinante *AcMNPV-PML/e* exprimierten das PML Protein der erwarteten Größenordnung von 90 kDa. Allerdings exprimierte der *pe38* Promotor beider Viren das heterologe *pml* Gen im Vergleich zum endogenen *pe38* Gen verspätet. Das Virus *AcMNPV-PML/1* exprimierte PML 6 Stunden später als PE38, während *AcMNPV-PML/e* PML nur 2 Stunden später als PE38 exprimierte.

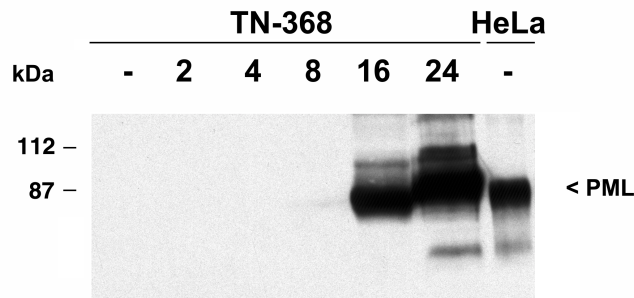


Abb. 7: Analyse der PML Expression in AcMNPV-PML/I infizierten TN-368 Zellen

TN-368 Zellen wurden mit dem rekombinanten Virus AcMNPV-PML/I infiziert und nukleäre Detergenz-Extrakte 2, 4, 8, 16 und 24 h p.i. präpariert. Außerdem wurden nukleäre Extrakte aus uninfizierten TN-368 Zellen (-) und transfizierten HeLa Zellen 48 Stunden nach der Transfektion präpariert. 5×10^6 HeLa Zellen wurden mit $35 \mu\text{g}$ des Plasmids pSG5-PML, das PML unter Kontrolle des SV40 Promotors exprimiert, transfiziert. Die Proteine wurden auf einem 8,5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und PML wurde mit mAB5E10 nachgewiesen. Der Pfeil markiert das PML spezifische Signal. Die Proteinstandards sind links aufgeführt.

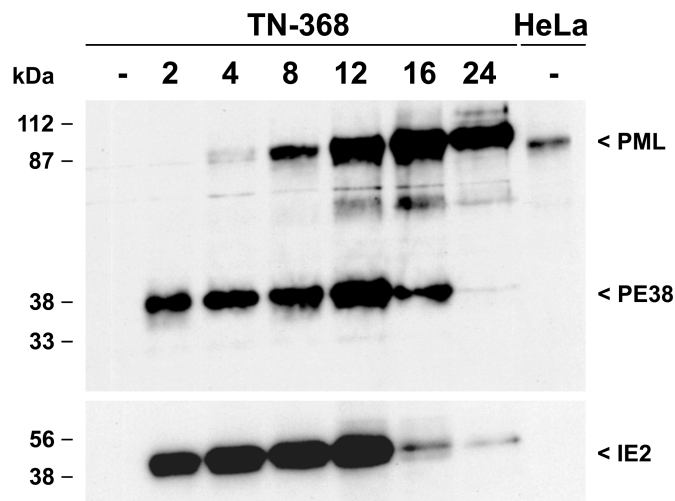


Abb. 8: Analyse der PML Expression in AcMNPV-PML/e infizierten TN-368 Zellen

TN-368 Zellen wurden mit dem rekombinanten Virus AcMNPV-PML/e infiziert und nukleäre Detergenz-Extrakte 2, 4, 8, 12, 16 und 24 h p.i. präpariert. Außerdem wurden nukleäre Extrakte aus uninfizierten TN-368 Zellen (-) und transfizierten HeLa Zellen 48 Stunden nach der Transfektion präpariert. 5×10^6 HeLa Zellen wurden mit $35 \mu\text{g}$ des Plasmids pSG5-PML, das PML unter Kontrolle des SV40 Promotors exprimiert, transfiziert. Die Proteine wurden auf einem 8,5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und PML mit mAB5E10 und PE38 mit polyklonalem anti-PE38 Kaninchenserum nachgewiesen. Nach mehrmaligem Waschen wurde die Membran mit polyklonalem anti-IE2 Kaninchenserum inkubiert. Die Pfeile markieren die PML, PE38 und IE2 spezifischen Signale. Die Proteinstandards sind links aufgeführt.

4. Lokalisierung von PML im Infektionsverlauf

Zur Untersuchung der Lokalisierung von PML im Infektionsverlauf wurde die PML exprimierende Rekombinante AcMNPV-PML/e ausgewählt, da sie eine Expression von PML während praktisch des gesamten Infektionszyklus garantierte. Außerdem exprimierte dieses Virus PML in der frühen Phase der Infektion, in der IE2 und PE38 in nukleären Domänen lokalisieren und daher als Zeitraum für Kolokalisierungsexperimente besonders interessant ist.

TN-368 Zellen wurden mit AcMNPV-PML/e infiziert und 2, 4, 8, 12 und 24 h p.i. fixiert. Anschließend wurde die Lokalisierung von PML mit Hilfe des monoklonalen PML Antikörpers nachgewiesen. Uninfizierte Zellen zeigten kein spezifisches PML Signal, sondern eine schwache Hintergrundfärbung (Abb. 9 a). Ab 2 h p.i. wurde PML in einzelnen infizierten Zellen nachgewiesen, deren Anzahl 4 h p.i. zunahm, bis 8 h p.i. alle Zellen PML exprimierten (Abb. 9 b-d). Gegenüber der Westernblot Technik konnte die Immunfluoreszenzfärbung die PML Expression schon 2 h p.i. in vereinzelt Zellen nachweisen. Zwischen 2 und 8 h p.i. lokalisierte PML in nukleären Domänen, die sich über den gesamten Zellkern erstreckten. Die PML Domänen variierten in ihrer Größe und Anzahl von Zelle zu Zelle. In der späten Phase der Infektion ab 12 h p.i. ereignete sich eine Umstrukturierung der PML Domänen (Abb. 9 e, f). Sie lokalisierten in dieser Infektionsphase fast ausschließlich in der äußeren Randregion des Zellkerns und der Zellkern wies neben den Domänen auch eine diffuse Färbung auf. Der Umfang und die Anzahl der PML Domänen nahm 24 h p.i. in dem Maße ab wie die diffuse Färbung des gesamten Zellkerns zunahm. Dabei korrelierte die diffuse Färbung mit einer starken PML Expression 12 und 24 h p.i. (Abb. 8). Diese Korrelation wies darauf hin, daß PML tatsächlich in der späten Phase der Infektion umorganisiert wurde und kein quantitativer Engpaß die Umstrukturierung bedingte.

PML assoziierte im Infektionsverlauf mit nukleären Domänen, die sich über den gesamten Zellkern verteilten. Dabei bildeten die PML Domänen eine dynamische Struktur im Zellkern, die sich im Vergleich zur frühen Phase der Infektion spät im Infektionsverlauf umstrukturierte.

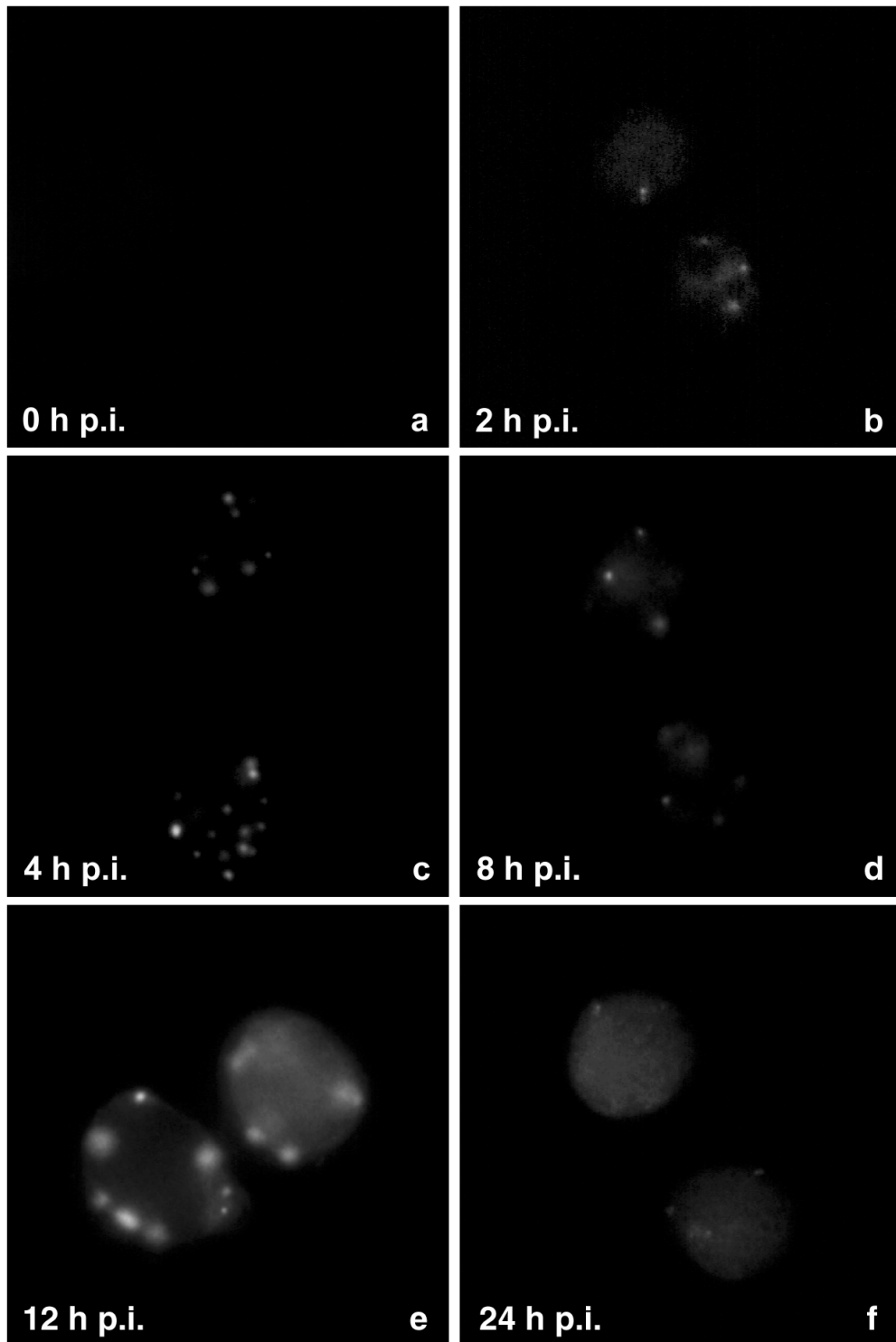


Abb. 9: Analyse der PML Lokalisierung im Infektionsverlauf

TN-368 Zellen wurden mit dem rekombinanten Virus *AcMNPV-PML/e* infiziert. Uninfizierte (a) und infizierte Zellen (b-f) wurden 2, 4, 8, 12 und 24 h p.i. in 2% Paraformaldehyd fixiert und PML durch indirekte Immunfluoreszenz mit mAB5E10 und FITC-gekoppelten Antikörpern nachgewiesen. Uninfizierte und infizierte Zellen wurden zur Kontrolle mit sekundärem Antikörper inkubiert und zeigten keine spezifischen Signale (Daten nicht gezeigt). Die Aufnahmen wurden mit Hilfe des Zeiss Mikroskops Axiovert 135 und einer Contax 167MT Kamera angefertigt.

5. Kolokalisierung von IE2 und PML im Infektionsverlauf

Obwohl PML nicht absolut zeitgleich mit PE38 und IE2 exprimiert wurde, erlaubte die Infektion mit AcMNPV-PML/e die Untersuchung einer möglichen Assoziation von IE2 oder PE38 mit PML, da 8 und 12 h p.i. jedes der drei Proteine stark synthetisiert wurde. Zu diesen Zeitwerten lokalisierte IE2 in nukleären Domänen, während PE38 in feinen granulären Strukturen beobachtet wurde. Deshalb wurde die Untersuchung auf die Analyse der Lokalisierung von IE2 und PML im Infektionsverlauf beschränkt. Die Kolokalisierungsexperimente gehen von der Vorstellung aus, daß das humane PML mit POD analogen Kernstrukturen der Insektenzelle assoziiert.

TN-368 Zellen wurden mit der Rekombinanten AcMNPV-PML/e infiziert und 4, 8, 12 und 24 h p.i. fixiert. PML und IE2 wurden mit monoklonalem PML Antikörper und polyklonalem IE2 Antiserum nachgewiesen. Zur Kontrolle wurden auch uninfizierte Zellen mit einem PML/IE2 Antikörpergemisch untersucht. Diese zeigten weder für PML noch für IE2 ein spezifisches Signal. Die Untersuchung der Insektenzellen, die rekombinantes Virus exprimierten, zeigte 4 h p.i. in allen Zellen IE2 Domänen, hingegen nur in wenigen PML (Abb. 10 A) und stand in Korrelation zur PML Expressionsanalyse AcMNPV-PML/e infizierter Zellen. Eine repräsentative Zelle ist in der Abbildung 10 dargestellt. Zellen, die IE2 und PML koexprimierten, beinhalteten immer mehr IE2 Domänen als PML Domänen (Abb. 10 A). Wurden die IE2 und PML Signale dieser Zellen überlagert, kolokalisierten die PML Domänen meistens mit den IE2 Domänen (Abb. 10 A). Ab 8 h p.i. exprimierten alle infizierten Zellen PML und IE2 gleichzeitig (Abb. 10 B). Immer noch konnten mehr IE2 Domänen als PML Domänen pro Zellkern nachgewiesen werden. Allerdings variierte das Verhältnis der IE2 Domänen zu PML Domänen von Zelle zu Zelle. In fast allen Zellen kolokalisierten IE2 und PML in gemeinsamen Domänen. Meistens konnte für jede PML Domäne eine korrespondierende IE2 Domäne gefunden werden (Abb. 10 B). In der späten Phase der Infektion nahm der Anteil der kolokalysierenden Domänen stark ab. Wurden Zellen 12 h p.i. untersucht, fand bereits die PML Umstrukturierung statt (Abb. 10 C). Außerdem veränderte sich die IE2 Lokalisierung von Domänen zu fadenförmigen Strukturen (Abb. 10 C). Die IE2 Signale verteilten sich nach wie vor über den ganzen Zellkern, während PML hauptsächlich im Randbereich des Zellkerns zu finden war. Obwohl IE2 fadenförmige Strukturen bildete, ergab die Überlagerung von IE2 und PML Signalen, daß beide Proteine kolokalysierten, wenn auch nur in einem geringen Anteil der Domänen (Abb. 10 C). 24 h p.i.

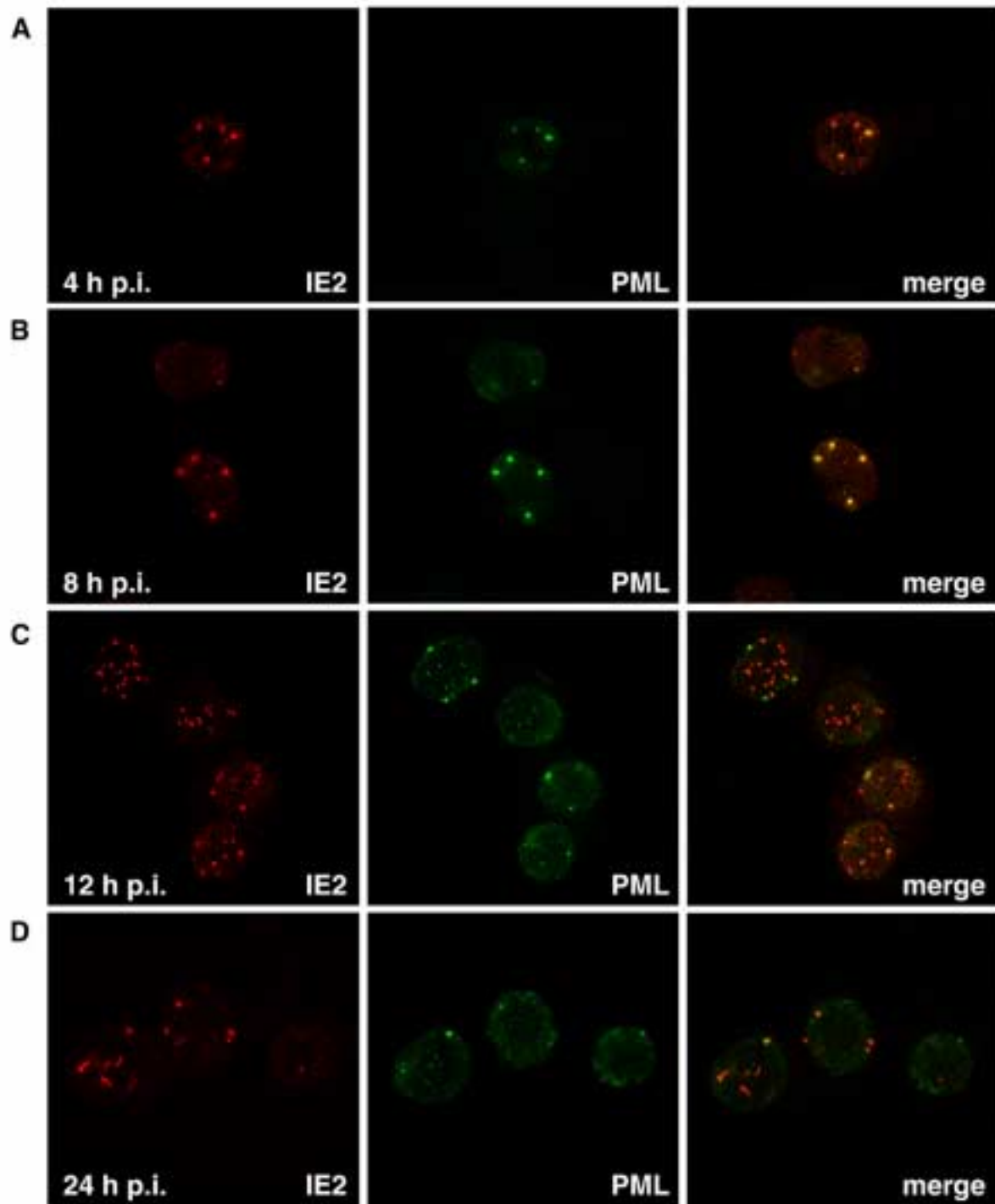


Abb. 10: Kolokalisierung von IE2 und PML im Infektionsverlauf

TN-368 Zellen wurden mit dem rekombinanten Virus AcMNPV-PML/e infiziert und 4, 8, 12 und 24 h p.i. (A-D) in 2% Paraformaldehyd fixiert. IE2 wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit polyklonalem anti-IE2 Kaninchenserum und PML mit mAB5E10 nachgewiesen. Dabei wurde IE2 mit Cy3-gekoppelten Antikörpern (rot) und PML mit FITC-gekoppelten Antikörpern (grün) sichtbar gemacht. In Kontrollexperimenten zeigte keiner der sekundären Antikörper eine Kreuzreaktion (Daten nicht gezeigt). Die Überlagerungen der Signale einer Zelle sind rechts dargestellt. Dabei zeigen gelbe Signale Kolokalisierung an. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskopsystems der Firma Leica angefertigt.

zeigte PML nur noch wenige Domänen pro Zellkern, die mit IE2 kolokalisieren könnten (Abb. 10 D). Die Überlagerung beider Signale ergab deshalb äußerst selten eine Kolokalisierung von IE2 und PML in gemeinsamen Domänen (Abb. 10 D).

Die Infektionsstudien zeigten, daß IE2 und PML in der frühen Phase der Infektion in gemeinsamen Domänen im Kern lokalisierten. Diese Domänen wurden im späten Infektionsverlauf umstrukturiert und wiesen auf eine dynamische Interaktion von IE2 mit PML und möglicherweise weiteren zellulären oder viralen Faktoren während des Infektionszyklus hin.

6. Assoziation von IE2 und PE38 mit PODs aus Säugerzellen

Die Lokalisierung von IE2 und PML in gemeinsamen Domänen in AcMNPV infizierten Zellen führte zu der Frage, ob IE2 das Potential besitzt mit PML der PODs aus Säugerzellen in Assoziation zu treten. Ein geeignetes System zur Analyse dieser Frage stellten Transfektionsexperimente der Säugerzelllinie BHK21 dar, da der PML Antikörper endogenes PML dieser Vertebratenzelllinie erkannte. Außerdem zeigten die Infektionsstudien, daß IE2 und PE38 2 h p.i. in gemeinsamen Domänen lokalisierten. Zu diesem Zeitpunkt war PML nur in einzelnen Zellen nachzuweisen, so daß eine Untersuchung der Assoziation von PE38 und PML während der Infektion schwer möglich war. Eine Möglichkeit zur Aufklärung der Frage über eine Assoziation von PE38 und PML bot ebenfalls die Transfektion von BHK21 Zellen.

6.1 Expression von IE2 und PE38 in BHK21 Zellen

Um IE2 und PE38 effizient im Säugersystem zu exprimieren, wurden beide Gene unter die Kontrolle des CMV Promotors kloniert (Abb. 1). Nach der Transfektion des Plasmids pCMV-PE38 lokalisierte PE38 hauptsächlich in nukleären Foci, deren Größe von Zelle zu Zelle variierte (Abb. 11 A). Im Vergleich zu PE38 Domänen in infizierten Zellen füllten diese Foci den Zellkern transfizierter Zellen stärker aus. Andere Zellen überexprimierten PE38 derart stark, daß sich PE38 Foci über die gesamte Zelle verteilten. Daneben konnten auch Zellen mit diffuser Kernfärbung beobachtet werden. Im Gegensatz dazu lokalisierte transient exprimiertes IE2 nicht in nukleären Foci. Die meisten Zellen zeigten eine Lokalisierung von IE2 in punktierten Strukturen und diffuser Kernfärbung oder nur diffuse Kernfärbung

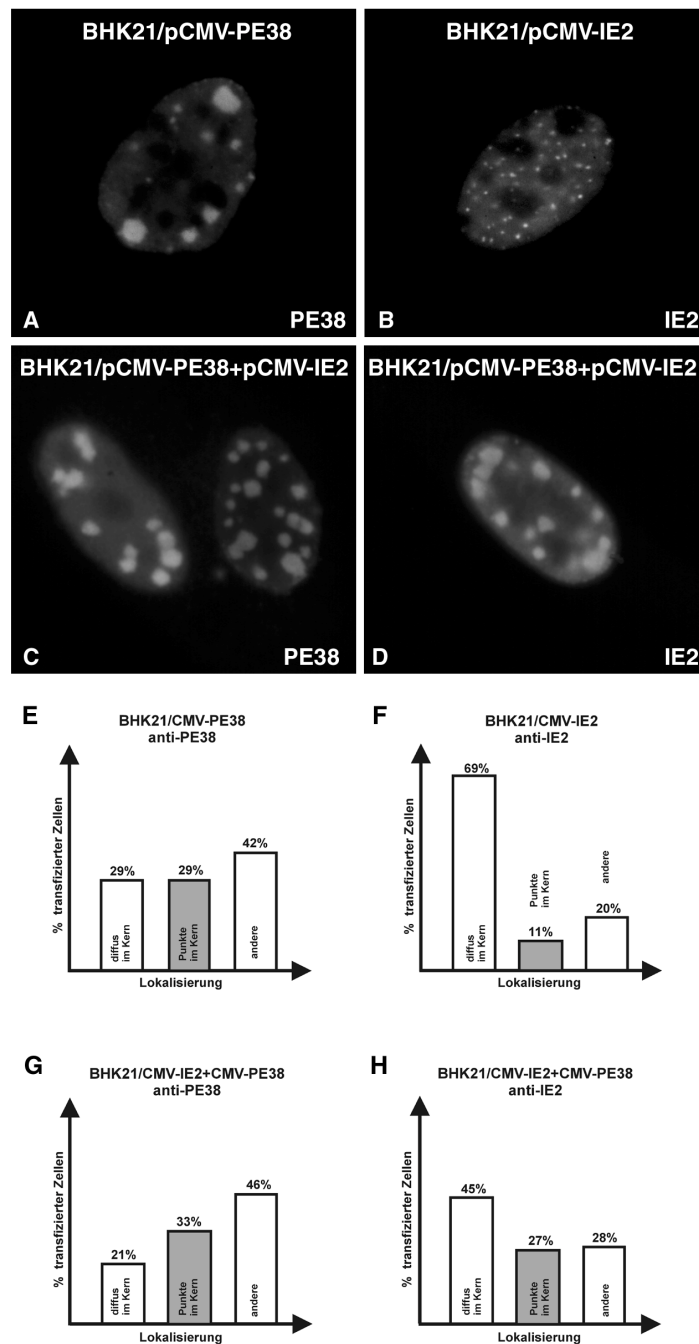


Abb. 11: Analyse der IE2 und PE38 Lokalisierung nach Transfektion der Säugerzelllinie BHK21

BHK21 Zellen wurden entweder mit den Plasmiden pCMV-PE38 (A) oder pCMV-IE2 (B) (Abb. 1) transfiziert oder mit beiden Plasmiden (C, D) kotransfiziert. Zur Transfektion mit DNA-Calciumpräzipitaten wurden pro Transfektion 5µg Plasmid DNA pro $3-5 \times 10^4$ Zellen eingesetzt. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in 2% Paraformaldehyd fixiert und IE2 (B, D) und PE38 (A, C) wurden durch polyklonale anti-IE2 oder anti-PE38 Kaninchenseren und FITC-gekoppelte Antikörper nachgewiesen. Die Lokalisierung von IE2 und PE38 wurde mit Hilfe eines Immunfluoreszenzmikroskops des Typs Olympus BH2-RFC analysiert. Die IE2 und PE38 Lokalisierungsmuster der transfizierten bzw. kotransfizierten Zellen wurden in die Gruppen „diffus im Kern“, „Punkte im Kern“ und „andere“ unterteilt. Danach wurde die Anzahl an Zellen, die IE2 bzw. PE38 Lokalisierungsmuster einer Gruppe zeigten, in 4 unabhängigen Experimenten bestimmt und in Relation zur Gesamtanzahl transfizierter Zellen betrachtet. Die Diagramme zeigen eine Übersicht über die Verteilung der IE2 und PE38 Lokalisierungsmuster der Transfektions- (E, F) bzw. Kotransfektionsexperimente (G, H).

(Abb. 11 B). Dabei überwog der Anteil an Zellen mit diffuser Kernfärbung stark (Abb. 11 F). Lokalisierte IE2 in punktierten Strukturen, sahen diese den nukleären Domänen der Infektion sehr ähnlich (Abb. 11 B). Zur Kontrolle wurden BHK21 Zellen mit dem Plasmid pBluescript (pBS) transfiziert und mit IE2 bzw. PE38 spezifischem Antikörper angefärbt. Diese Zellen zeigten keine Signale für IE2 oder PE38. Um den Anteil transfizierter Zellen zu bestimmen, die PE38 oder IE2 in nukleären Domänen/Foci zeigten, wurden die Zellkerne von 4 unabhängigen Transfektionen ausgezählt. Die transfizierten Zellen wurden Gruppen zugeordnet, je nach Lokalisierung den Gruppen „diffus im Kern“, „Punkte im Kern“ oder der Gruppe „andere“. Die Gruppe „andere“ enthielt zum Beispiel Zellen mit PE38 Lokalisierungsmustern, die auf PE38 Überexpression beruhen könnten. Die Anzahl transfizierter Zellkerne mit IE2 in punktierten Strukturen (11%) war deutlich geringer als die Anzahl mit PE38 in nukleären Foci (29%) (Abb. 11 E, F).

Nach Kotransfektion der IE2 und PE38 exprimierenden Plasmide konnte die Anzahl an Zellen, die IE2 in punktierten Strukturen zeigte, auf 27% erhöht, also mehr als verdoppelt werden (Abb. 11 H). Außerdem wurde IE2 in einigen Zellen in nukleären Foci nachgewiesen (Abb. 11 D), die zuvor nur bei der Transfektion von PE38 auftraten. Dagegen hatte eine Koexpression von IE2 keinen Einfluß auf die Lokalisierung von PE38 (Abb. 11 C). Der Anteil der transfizierten Zellen, die PE38 in nukleären Foci zeigte, blieb auch nach Kotransfektion von IE2 konstant (Abb. 11 E, G). Eine Doppelfärbung der kotransfizierten Zellen mit IE2 Antiserum und PE38 Antiserum zeigte die Kolokalisierung von IE2 und PE38 in gemeinsamen Domänen (Abb. 12 C). Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, daß die Expression von PE38 eine Rekrutierung von IE2 in nukleäre Foci verursachte.

Sowohl IE2 als auch PE38 lokalisierten in BHK21 Zellen in nukleären Domänen. Dabei traten IE2 Domänen wesentlich seltener auf als PE38 Foci. Außerdem konnte die Kolokalisierung von IE2 und PE38 in gemeinsamen Domänen und ein Einfluß der PE38 Expression auf die IE2 Lokalisierung in nukleären Domänen beobachtet werden.

6.2 Potentielle Kolokalisierung von PML mit IE2 und PE38 in BHK21 Zellen

Zur Untersuchung der Assoziation von IE2 und PE38 mit PML aus säugerzellspezifischen PODs wurden BHK21 Zellen entweder mit dem Plasmid pCMV-IE2 oder pCMV-PE38 transfiziert. Das endogene PML der PODs wurde mittels des monoklonalen Antikörpers und IE2 bzw. PE38 mit polyklonalen Antiseren nachgewiesen. Die konfokale mikroskopische

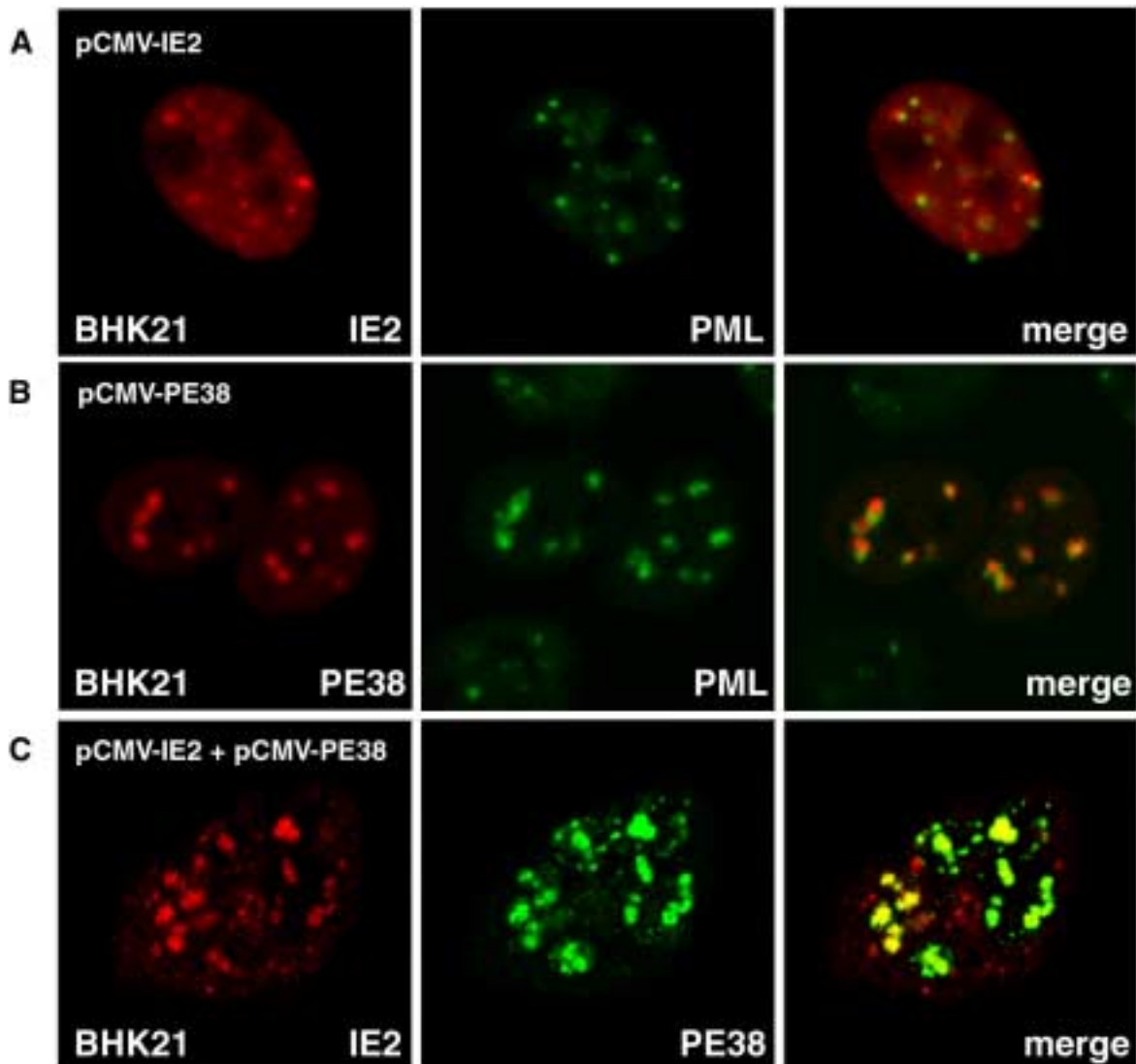


Abb. 12: Potentielle Kolokalisierung von IE2/PML, PE38/PML und IE2/PE38 nach Transfektion der Säugerzelllinie BHK21

BHK21 Zellen wurden entweder mit den Plasmiden pCMV-IE2 (A) oder pCMV-PE38 (B) (Abb. 1) transfiziert oder mit beiden Plasmiden (C) kotransfiziert. Zur Transfektion mit DNA-Calcium-präzipitaten wurden pro Transfektion $5\mu\text{g}$ Plasmid DNA pro $3\text{-}5 \times 10^4$ Zellen eingesetzt. Nach der Fixierung 48 Stunden nach der Transfektion in 2% Paraformaldehyd wurden IE2 und PE38 durch polyklonale anti-IE2 bzw. anti-PE38 Kaninchenserum und PML mit mAB5E10 nachgewiesen (A, B). Bei der Kotransfektion wurde IE2 mit polyklonalem anti-IE2 Mausserum und PE38 mit anti-PE38 Kaninchenserum nachgewiesen (C). IE2 wurde durch Cy3-gekoppelte Antikörper (rot) (A, C) und PML durch FITC-gekoppelte Antikörper (grün) (A, B) sichtbar gemacht. Zum Nachweis von PE38 wurde entweder ein Cy3-gekoppelter Antikörper (rot) (B) oder ein FITC-gekoppelter Antikörper (grün) (C) verwendet. Die Überlagerungen der Signale einer Zelle sind rechts dargestellt. Dabei zeigen gelbe Signale Kolokalisierung an. Zur konfokalen Analyse wurde sowohl ein Mikroskopsystem der Firma Zeiss (A, B) als auch ein Mikroskopsystem der Firma Leica (C) verwendet.

Analyse transfizierter Zellen, die IE2 in punktierten Strukturen zeigten, ergab nach der Überlagerung von IE2 und PML Signalen eine Assoziation einiger IE2 Punkte mit PML Domänen (Abb. 12 A). In PE38 exprimierenden BHK21 Zellen wurde die konfokale Analyse in Zellen mit relativ kleinen nukleären Foci durchgeführt. In den meisten dieser Zellen assoziierte PE38 mit PML in PODs. (Abb. 12 B). Außerdem wurden BHK21 Zellen mit pBS transfiziert. Diese Zellen zeigten nach Inkubation mit IE2, PE38 oder PML Antikörpern nur Signale für PML. Die PML Lokalisierung dieser Zellen unterschied sich nicht von untransfizierten Zellen.

Diese Ergebnisse zeigten, daß die viralen Proteine PE38 und IE2 beide das Potential besitzen, mit endogenen PML Domänen in BHK21 Zellen zu assoziieren.

7. Potentielle Kolokalisierung von IE2/PML, PE38/PML und IE2/PE38 in transfizierten TN-368 Zellen

Nachdem PE38 in Assoziation mit PML onkogenen Domänen in Säugerzellen beobachtet wurde, stellte sich die Frage, ob PE38 und PML auch in Insektenzellen in gemeinsamen Strukturen organisiert sind. Aufschluß über diese Frage gab die transiente Koexpression beider Proteine in TN-368 Zellen. Das Plasmid pe38PML-HR1 garantierte eine effiziente PML Expression in Insektenzellen (Abb. 4 A). Zur Expression von PE38 wurden zwei Plasmide ausgewählt, das stark PE38 exprimierende Plasmid pFHC-HR1 (Abb. 1), das neben PE38 auch IE2 exprimierte, und pPE38-HR1 (Abb. 1), das PE38 schwächer, aber autonom exprimierte (Krappa et al., 1995). Beide Plasmide beinhalten die homologe Region hr1 als potentielles Enhancer Element zur Erhöhung der transkriptionellen Aktivität (Guarino et al., 1986).

Nach der Transfektion PE38 exprimierender Plasmide lokalisierte PE38 meist im Gegensatz zur Infektion in nukleären Foci, die sich über den gesamten Zellkern verteilten (Abb. 13 C, D). Die PE38 Expression des Plasmids pFHC-HR1 war wie erwartet stärker als die des Plasmids pPE38-HR1 (Krappa et al., 1995), so daß nach Transfektion von pFHC-HR1 mehr Zellen PE38 Foci zeigten, die einen Großraum des Zellkern einnahmen (Abb. 13 C). In Anwesenheit von transient exprimiertem PML wurde ein partielles Überschneiden der PE38 Foci mit PML Domänen in mehreren Zellen beobachtet (Abb. 13 C, D). Die Assoziation von PML und PE38 war nach Transfektion von pFHC-HR1 offensichtlicher als nach Transfektion

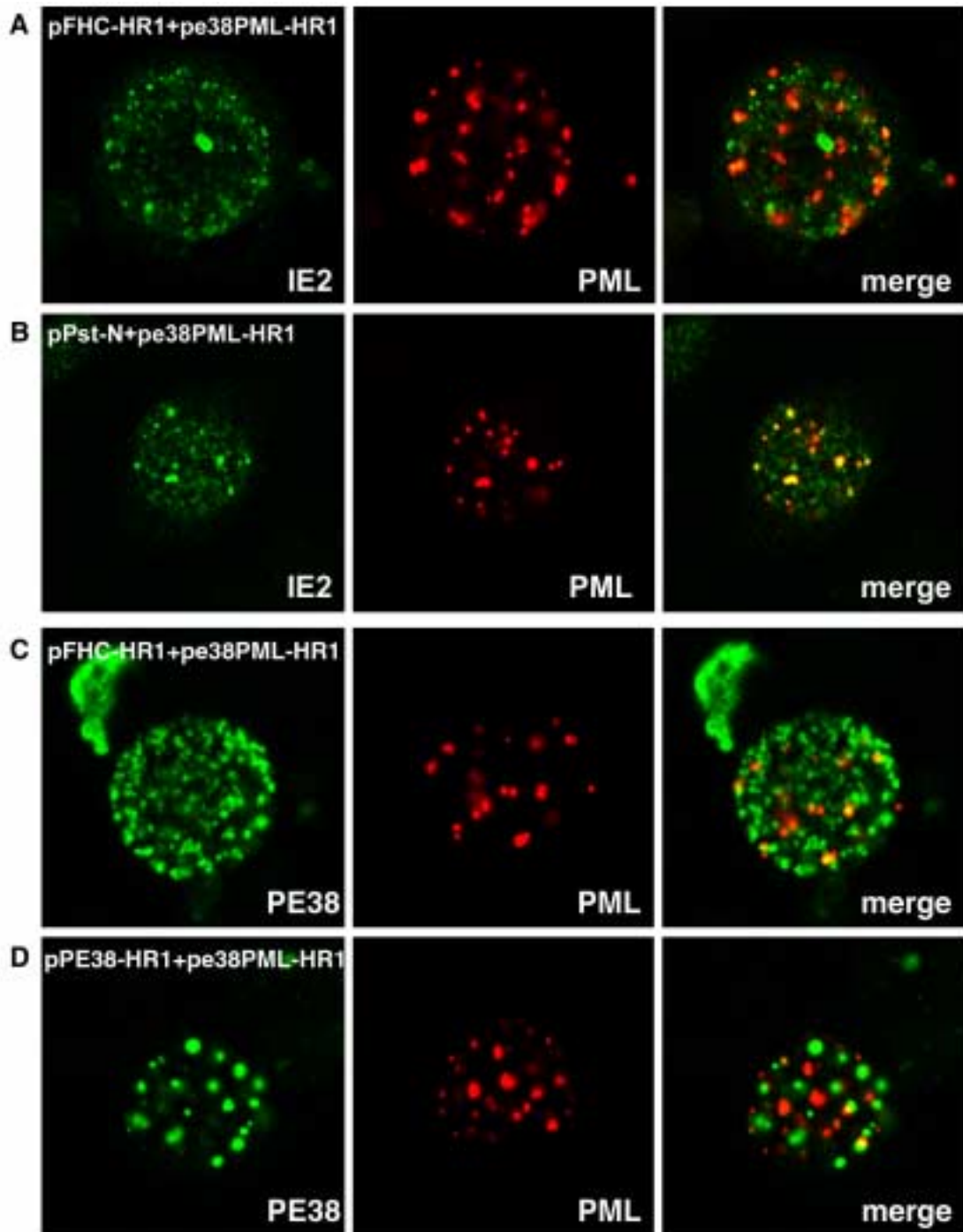


Abb. 13: Potentielle Kolokalisierung von IE2/PML und PE38/PML nach Transfektion der Insektenzelllinie TN-368

TN-368 Zellen wurden mit dem Plasmid pFHC-HR1 (A, C), pPst-N (B) oder pPE38-HR1 (D) (Abb. 1) in Gegenwart von pe38PML-HR1 kotransfiziert. Zur Liposomentransfektion wurde je $1\mu\text{g}$ Plasmid DNA pro 5×10^4 Zellen eingesetzt. Nach der Fixierung in Aceton wurden die Zellen entweder mit polyklonalem anti-IE2 Kaninchenserum und mAB5E10 (A, B) oder mit anti-PE38 Kaninchenserum und mAB5E10 (C, D) angefärbt. Zum Nachweis von IE2 und PE38 wurden FITC-gekoppelte Antikörper (grün) und zum Nachweis von PML Cy3-gekoppelte Antikörper (rot) verwendet. Die Überlagerungen der Signale einer Zelle sind rechts dargestellt. Dabei zeigen gelbe Signale Kolokalisierung an. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskopsystems der Firma Leica angefertigt.

von pPE38-HR1, das ausschließlich PE38 exprimierte. Die Koexpression von IE2 oder die stärkere Überexpression von PE38 könnte für diese Beobachtung eine Rolle spielen. Zellen, die mit dem Plasmid pBS transfiziert wurden, zeigten weder für PE38 noch für PML Signale. Außerdem wurden PML transfizierte Zellen mit PE38 Antikörper und PE38 transfizierte Zellen mit PML Antikörper behandelt, um eine Kreuzreaktion der Antikörper auszuschließen. Keine der Kontrollen zeigte Signale über Hintergrundfärbung.

Im Gegensatz zu PE38 zeigte IE2 nach Transfektion des Plasmids pPst-N (Abb. 1), das ausschließlich IE2 exprimierte oder des Plasmids pFHC-HR1 (Abb. 1) die Lokalisierung in nukleären Domänen, die denen der Infektion sehr ähnlich waren (Abb. 13 A, B). Nach der transienten Koexpression von PML zeigte die konfokale Analyse der Zellen, die IE2 von pPst-N und PML von pe38PML-HR1 exprimierten, die Kolo-kalisierung von IE2 und PML in gemeinsamen Domänen und bestätigte die Ergebnisse der Infektionsstudien (Abb. 13 B). Wurde IE2 von pFHC-HR1 exprimiert, konnte die Kolo-kalisierung von IE2 und PML seltener beobachtet werden (Abb. 13 A). Kontrollen, adäquat zur beschriebenen PE38/PML Kotransfektion, wurden für die IE2/PML Kotransfektion durchgeführt und ergaben keine spezifischen Signale.

Nach der Transfektion von pFHC-HR1 und Kofärbung von IE2 und PE38 wurde nach der Überlagerung von PE38 und IE2 Signalen die Kolo-kalisierung beider Proteine in gemeinsamen Domänen auch in Abwesenheit viraler Infektion nachgewiesen (Abb. 14). Dabei spielte es keine Rolle, ob PE38 in vielen nukleären Foci (Abb. 14 B) oder in wenigen nukleären Foci (Abb. 14 A) lokalisierte. Zellen mit wenigen Foci zeigten jedoch eine deutlichere Kolo-kalisierung.

Die Assoziation von IE2 und PE38 sowie die Assoziation von PML mit beiden viralen Proteinen in transfizierten Insektenzellen korrelierte mit den Beobachtungen der Transfektionsexperimente in BHK21 Zellen und mit den Ergebnissen der Infektionsstudien, die IE2 und PML im Infektionsverlauf bzw. IE2 und PE38 2 h p.i. in gemeinsamen Domänen nachwiesen.

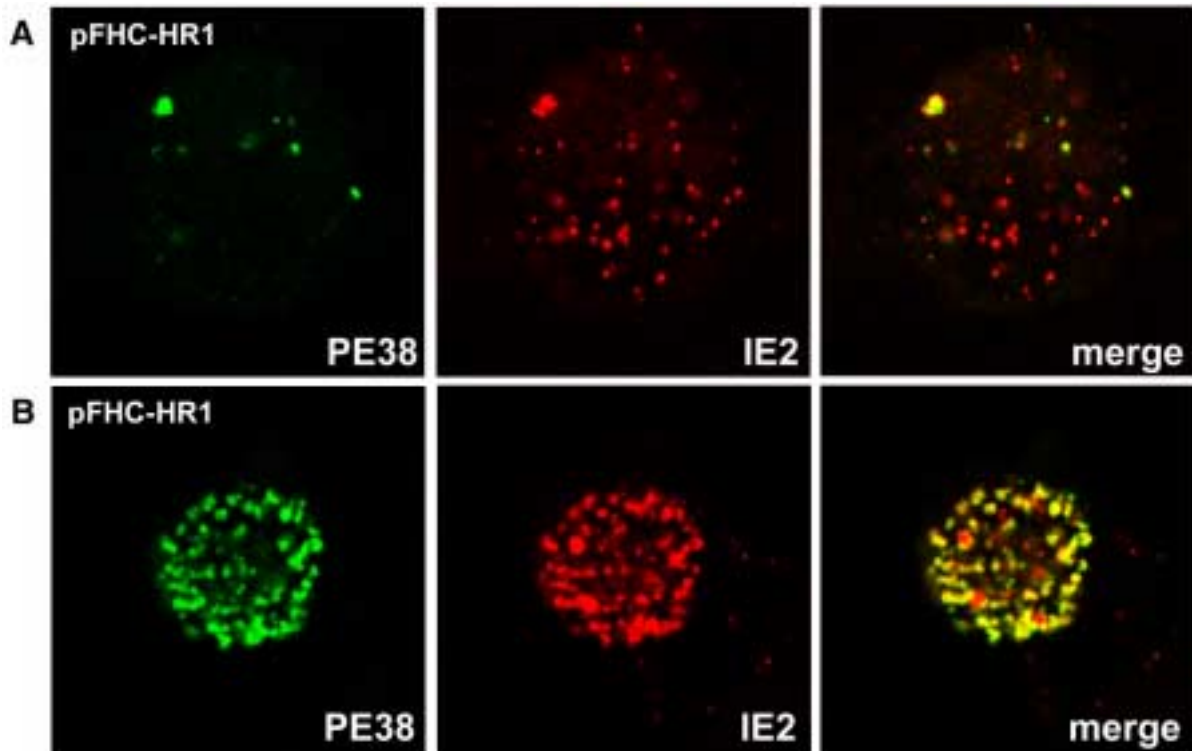


Abb. 14: Potentielle Kolokalisierung von IE2 und PE38 nach Transfektion der Insektenzelllinie TN-368

TN-368 Zellen wurden mit dem Plasmid pFHC-HR1 (Abb. 1) transfiziert und 48 Stunden nach der Transfektion in Aceton fixiert (A, B). Bei der Transfektion mit Liposomenkomplexen wurde $1\mu\text{g}$ Plasmid DNA pro 5×10^4 Zellen eingesetzt. IE2 wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit polyklonalem anti-IE2 Mausserum und PE38 mit polyklonalem anti-PE38 Kaninchenserum nachgewiesen. Dabei wurde IE2 mit Cy3-gekoppelten Antikörpern (rot) und PE38 mit FITC-gekoppelten Antikörpern (grün) sichtbar gemacht. Die Überlagerungen der Signale einer Zelle sind rechts dargestellt. Dabei zeigen gelbe Signale Kolokalisierung an. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskopsystems der Firma Leica angefertigt.

8. Assoziation der IE2 Domänen mit Faktoren der viralen Replikation

IE2 assoziierte sowohl mit dem viralen Faktor PE38 als auch mit dem potentiellen zellulären Faktor PML. Die Vorstellung, daß IE2, PE38 und PML die einzigen Aktionspartner in der IE2 Domäne darstellen, ist unwahrscheinlich. Deshalb wurden andere virale Proteine, die sich wie IE2 während des Infektionszyklus in Domänen organisierten, auf ihre Assoziation mit IE2 untersucht. LEF-3 und DBP sind späte baculovirale Faktoren, die beide nukleäre Domänen bilden und eine Rolle bei der viralen Replikation spielen (Okano et al., 1999). Die indirekte Immunfluoreszenz infizierter Zellen zeigte ab 4 h p.i. erste Signale für LEF-3 und DBP (Abb. 15, 16). Beide Proteine lokalisierten in nukleären Domänen, die sich im Zellkern homogen verteilten (Abb. 15 A, Abb. 16 A). 8 h p.i. exprimierten alle Zellen DBP und LEF-3 und die Größe der einzelnen DBP bzw. LEF-3 Domänen nahm zu, bis spät in der Infektion im gesamten Zellkern granuläre Signale zu beobachten waren (Abb. 15 B, Abb. 16 C, Abb. 24 B). Die Lokalisierung von DBP und LEF-3 war über den gesamten Infektionsverlauf sehr ähnlich, zeigte aber im Vergleich zur IE2 Lokalisierung größere Heterogenität.

8.1 Assoziation von IE2 und LEF-3 in der frühen Phase der Infektion

Um die mögliche Assoziation von IE2 mit LEF-3 zu untersuchen, wurden TN-368 Zellen mit AcMNPV infiziert und 0, 4 und 8 h p.i. analysiert. IE2 wurde mit Hilfe des polyklonalen Antiserums aus Maus und LEF-3 mittels eines polyklonalen Antiserums aus Kaninchen (Evans und Rohrmann, 1997) markiert. Uninfizierte Zellen zeigten keine Signale für IE2 oder LEF-3. 4 h p.i. lokalisierte IE2 in nukleären Domänen, während LEF-3 nur von wenigen Zellen nachweisbar exprimiert wurde (Abb. 15 A). Die IE2/LEF-3 koexprimierenden Zellen zeigten immer mehr IE2 Domänen als LEF-3 Domänen. Durch die Überlagerung beider Signale konnte die Assoziation einiger IE2 und LEF-3 Domänen 4 h p.i. nachgewiesen werden (Abb. 15 A). 8 h p.i. nahmen die LEF-3 Signale extrem an Größe zu und bildeten große Strukturen aus, so daß eine Assoziation von IE2 und LEF-3 zwar beobachtet werden konnte, die Signifikanz dieser Assoziation aufgrund der Größe der LEF-3 Domänen jedoch fraglich war (Abb. 15 B).

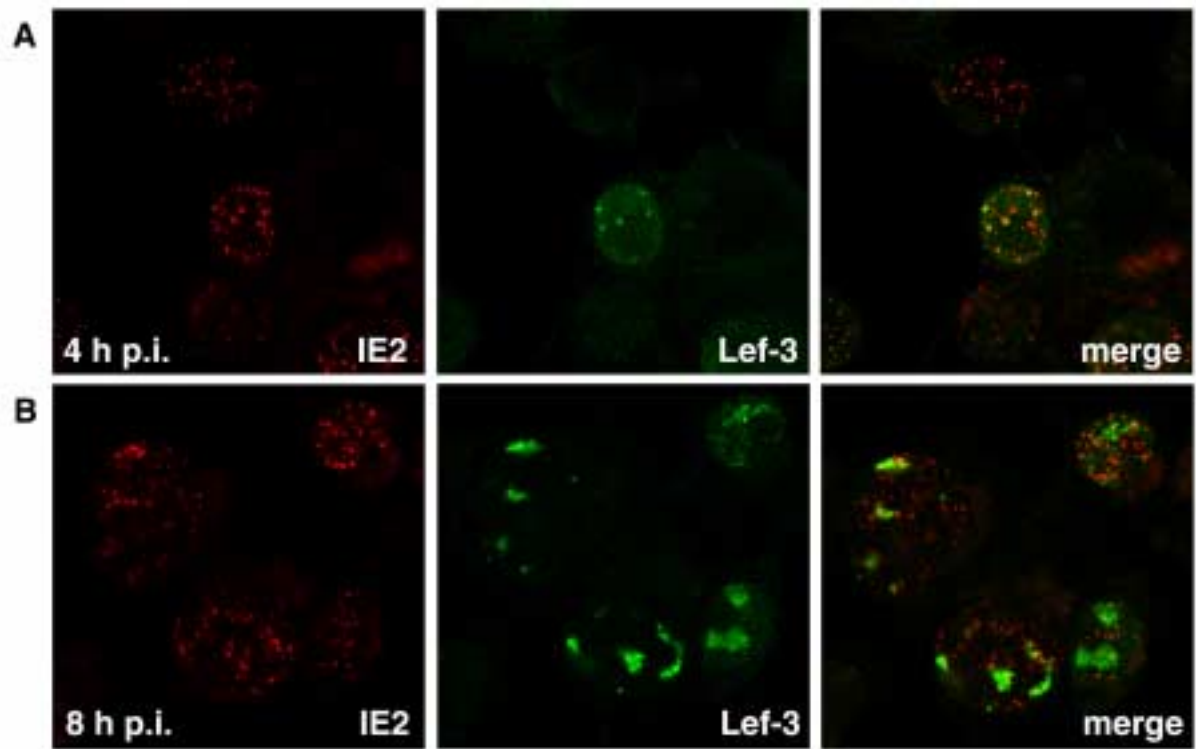


Abb. 15: Assoziation von IE2 und LEF-3 in der frühen Phase der Infektion

TN-368 Zellen wurden mit wt AcMNPV Virus infiziert und 4 und 8 h.p.i. in 2% Paraformaldehyd fixiert (A, B). IE2 wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit polyklonalem anti-IE2 Mausserum und LEF-3 mit polyklonalem anti-LEF-3 Kaninchenserum nachgewiesen. Dabei wurde IE2 mit Cy3-gekoppelten Antikörpern (rot) und LEF-3 mit FITC-gekoppelten Antikörpern (grün) sichtbar gemacht. Die Überlagerungen der Signale einer Zelle sind rechts dargestellt. Dabei zeigen gelbe Signale Kolokalisierung an. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskopsystems der Firma Leica angefertigt. Zur Kontrolle wurden uninfizierte Zellen mit primären und sekundären Antikörpern inkubiert und zeigten weder für IE2 noch für LEF-3 spezifische Signale (Daten nicht gezeigt).

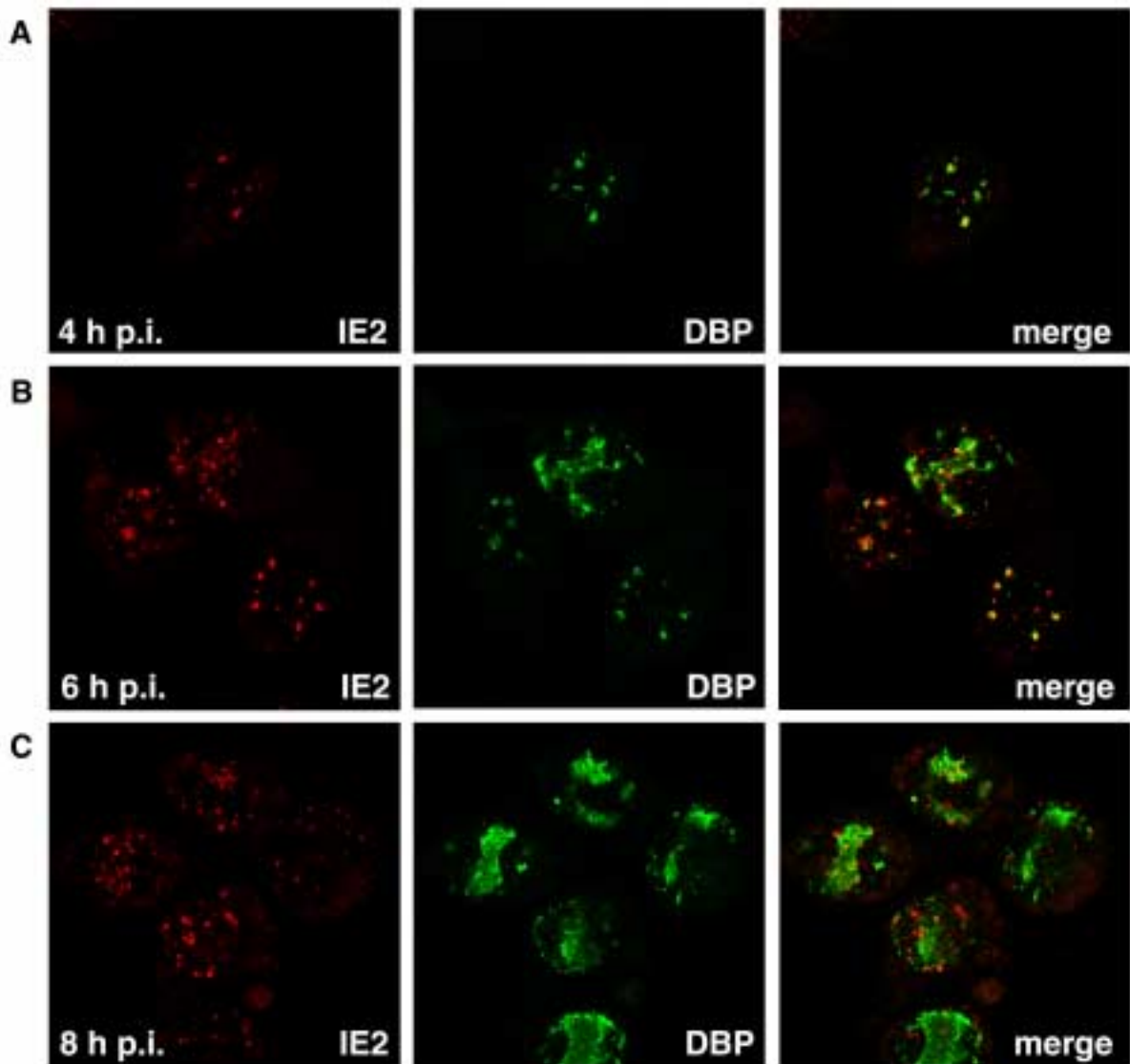


Abb. 16: Assoziation von IE2 und DBP in der frühen Phase der Infektion

TN-368 Zellen wurden mit wt AcMNPV Virus infiziert und 4, 6 und 8 h p.i. in 2% Paraformaldehyd fixiert (A-C). IE2 wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit polyklonalem anti-IE2 Mausserum und DBP mit polyklonalem anti-DBP Kaninchenserum nachgewiesen. Dabei wurde IE2 durch Cy3-gekoppelte Antikörper (rot) und DBP durch FITC-gekoppelte Antikörper (grün) sichtbar gemacht. Die Überlagerungen der Signale einer Zelle sind rechts dargestellt. Dabei zeigen gelbe Signale Kolokalisierung an. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskopsystems der Firma Leica angefertigt. Die Analyse uninfizierter Zellen mit primären und sekundären Antikörpern ergab weder für IE2 noch für DBP spezifische Signale (Daten nicht gezeigt).

8.2 Assoziation von IE2 und DBP in der frühen Phase der Infektion

Aus den IE2/LEF-3 Lokalisierungsstudien ging hervor, daß IE2 früh in der Infektion mit LEF-3 Domänen assoziiert. Deshalb wurde neben den Zeitwerten 4 und 8 h p.i. auch der Zeitwert 6 h p.i. für die Analyse der IE2/DBP Assoziation untersucht. Dabei wurde zum Nachweis von DBP ein polyklonales Antiserum verwendet, das gegen konserviertes DBP aus *Bombyx mori* Kernpolyederviren gerichtet war (Okano et al., 1999). Das Antiserum erkannte in Immunfluoreszenzstudien infizierter Zellen das DBP Homolog von AcMNPV, färbte aber kein Antigen in uninfizierten Zellen. 4 h p.i. begann die Expression von DBP in den ersten Zellen (Abb. 16 A). Dagegen exprimierten alle infizierten Zellen IE2. Eine Überlagerung der IE2 und DBP Signale ergab die Assoziation von IE2 und DBP in einem Teil der IE2 Domänen (Abb. 16 A). Es konnten aber sowohl IE2 als auch DBP Domänen ohne doppeltes Signal beobachtet werden (Abb. 16 A-C). 6 h p.i. koexprimierte ein größerer Anteil der infizierten Zellen DBP und IE2 und die ersten Zellen zeigten bereits DBP in großen Strukturen (Abb. 16 B). Nach wie vor wurde in Zellkernen mit kleinen DBP Domänen die Kolo-kalisierung von IE2 und DBP beobachtet (Abb. 16 B). Danach, ab 8 h p.i., waren DBP Strukturen so ausgedehnt, daß oft über 50 % des Zellkerns von ihnen eingenommen wurden (Abb. 16 C). IE2 lokalisierte sowohl in diesen großen Bereichen als auch außerhalb (Abb. 16 C).

Diese Studien zeigten 4 und 6 Stunden nach Beginn der Infektion die Assoziation einiger IE2 Domänen mit den viralen Faktoren DBP und LEF-3 und könnten daher auf eine Rolle von IE2 bei der Replikation des Virusgenoms hinweisen.

9. Immunpräzipitation der IE2 Domäne im Infektionsverlauf

Neben den bisher beschriebenen Lokalisierungsstudien, die PML, PE38 und vielleicht auch DBP oder LEF-3 als Assoziationspartner von IE2 in nukleären Domänen zeigten, können Immunpräzipitationsexperimente Hinweise auf weitere Komponenten der IE2 Domäne liefern bzw. die Präsenz der assoziierten Partner überprüfen.

Die Immunpräzipitation sollte die IE2 Domäne isolieren und mit Hilfe der Westernblot Technik nachweisen. Dazu wurde polyklonales IE2 Antiserum aus Kaninchen kovalent an

eine Sepharosematrix gebunden. Es wurden Kernextrakte uninfizierter und infizierter Zellen 2 und 6 h p.i. präpariert. Anschließend wurde die IE2 Domäne bzw. Bestandteile dieser Domäne mit Hilfe des immobilisierten IE2 Antiserums aus diesen Extrakten isoliert. Die präzipitierten Proteine wurden auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit einer Immunfärbung nachgewiesen. Zur Kontrolle wurden infizierte und uninfizierte Extrakte aufgetragen. Diese zeigten 2 und 6 h p.i. IE2 Banden, die leicht über der erwarteten Größe von 49 kDa lagen (Krappa et al., 1995) (Abb. 17, Spur 2,3). Nach Immunpräzipitation der Domäne konnte das IE2 Protein 2 und 6 h p.i. mit IE2 Antiserum nachgewiesen werden (Abb. 17, Spur 5,6). Bei der Immunfärbung wurde auch die Immunglobulinbande (IgG) des Serums sichtbar (Abb. 17, Spur 4-6). Ihre Größe lag im Bereich von 50 kDa und war nur schwer von der IE2 Bande zu trennen. Nach der Immunfärbung mit IE2 Antiserum konnte in Extrakten 0 h p.i. sowohl vor als auch nach der Immunpräzipitation mit anti-IE2 Sepharose kein spezifisches Signal nachgewiesen werden (Abb. 17, Spur 1,4).

Die Immunpräzipitation der IE2 Domäne zeigte, daß immobilisierte IE2 Antikörper geeignet waren, die IE2 Domäne zu präzipitieren. Eine effiziente Trennung der IE2 Bande und der Immunglobulinbande war trotz ähnlichem Molekulargewicht der Proteine möglich.

9.1 Koimmunpräzipitation von PE38 und DBP als Komponente der IE2 Domäne im Infektionsverlauf

Die Lokalisierungsstudien zeigten die Kolo-kalisierung von PE38 und IE2 2 h p.i. und nach der Transfektion der Zelllinien TN-368 und BHK21. Um zu ermitteln, ob PE38 Teil der IE2 Domäne war, wurden Kernextrakte, die 2 und 6 h p.i. präpariert wurden, mit anti-IE2 Sepharose immunpräzipitiert. Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembran konnte mit PE38 spezifischem Antiserum das ca. 38 kDa (Krappa und Knebel-Mörsdorf, 1991) große PE38 Protein nicht nur als Komponente der IE2 Präzipitate 2 h p.i. sondern auch 6 h p.i. nachgewiesen werden (Abb. 17, Spur 10,11). Die Bande korrelierte mit dem Signal aus Kernextrakten 2 h p.i. (Abb. 17, Spur 8). Aus uninfizierten Kernextrakten konnte kein PE38 koimmunpräzipitiert werden (Abb. 17, Spur 7,9).

Die indirekten Immunfluoreszenzstudien infizierter Zellen zeigten 6 h p.i. die Assoziation einiger IE2 Domänen mit DBP. Ob diese IE2 Domänen auch DBP komplexierten, wurde durch Präzipitation mit immobilisiertem IE2 Antiserum getestet. Dazu wurden Kernextrakte

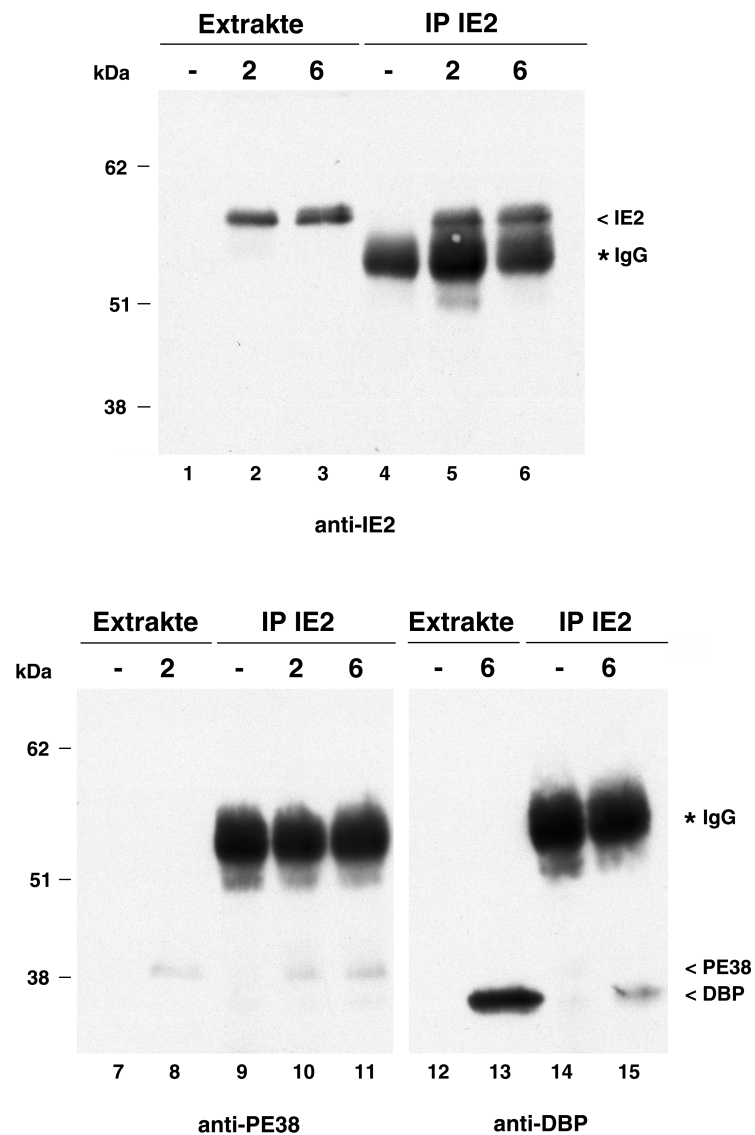


Abb. 17: Immunpräzipitation des IE2 Komplexes unter Kopräzipitation von PE38 und DBP im Infektionsverlauf

TN-368 Zellen wurden mit wt AcMNPV Virus infiziert und Kernextrakte aus uninfizierten (-) und infizierten Zellen 2 und 6 h p.i. präpariert. Anschließend wurden je 150 μ g der Kernextrakte mit Benzonase behandelt und zur Präzipitation der IE2 Komplexe mit anti-IE2 Sepharose eingesetzt. Die präzipitierten Proteine wurden auf 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und zur Kontrolle der Signalspezifität wurden je 75 μ g der unpräzipitierten Extrakte aufgetragen (Spur 1-3, 7, 8, 12, 13). IE2 wurde mit polyklonalem anti-IE2 Kaninchenserum nachgewiesen (Spur 1-6). Die Kopräzipitation von PE38 und DBP wurde mit polyklonalem anti-PE38 Kaninchenserum (Spur 7-11) bzw. durch anti-DBP Kaninchenserum (Spur 12-15) sichtbar gemacht. Die Pfeile markieren die IE2, PE38 und DBP spezifischen Signale und die IgG Bande der zur Präzipitation eingesetzten Antikörper ist mit einem Stern markiert. Die Proteinstandards sind links aufgeführt.

aus infizierten Zellen 6 h p.i. präpariert und mit anti-IE2 Sepharose präzipitiert. Nach der Immunfärbung der Membran mit DBP spezifischem Antiserum, wurde ein ca. 37 kDa großes DBP Signal (Mikhailov et al., 1998) sowohl in den Extrakten, die 6 h p.i. präpariert wurden, als auch nach der IE2 Immunpräzipitation dieser Extrakte nachgewiesen (Abb. 17, Spur 13,15). In uninfizierten Extrakten erkannte das DBP Antiserum weder vor noch nach der Präzipitation ein Antigen (Abb. 17, Spur 12,14).

Mit Hilfe der Immunpräzipitation konnten sowohl PE38 als auch DBP als Komponenten der IE2 Domänen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Lokalisierungsstudien, die PE38 und IE2 ab 4 h p.i. nicht mehr in gemeinsamen Domänen zeigten, kopräzipitierte PE38 mit IE2 2 und 6 h p.i. DBP ließ sich zusammen mit nukleären IE2 Komplexen 6 h p.i. präzipitieren. Dieses Ergebnis steht in Korrelation mit den Immunfluoreszenzstudien, die eine mögliche Assoziation von IE2 und DBP zeigten.

9.2 Kontrollexperimente zur IE2 Immunpräzipitation

9.2.1 Allgemeine Kontrollen

Um die Spezifität der IE2 Immunpräzipitation zu kontrollieren, wurden folgende Experimente durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden die Präzipitate aller untersuchten Zeitwerte auf IE2 Protein untersucht. Dadurch wurde sichergestellt, daß die anti-IE2 Sepharose tatsächlich IE2 als Antigen präzipitierte (Abb. 18, Spur 3-5). Um die Spezifität der Koimmunpräzipitationen zu überprüfen, wurde als Negativkontrolle eine Immunpräzipitation mit ungekoppelter Sepharose durchgeführt. Diese Kontrolle zeigte weder für die Kopräzipitation von PE38 noch für die Kopräzipitation von DBP charakteristische Signale (Abb. 18, Spur 9,13) und sicherte die Spezifität der Kopräzipitation. Als weitere Negativkontrolle wurden Kernextrakte, die das IE2 Antigen nicht enthielten, z. B. Extrakte aus uninfizierten Zellen, präzipitiert. Weder für IE2 noch für PE38 oder DBP konnten in diesen Präzipitaten Signale nachgewiesen werden (Abb. 18, Spur 3,6,10). Um eine unspezifische Kopräzipitation der Proteine PE38 und DBP über DNA oder RNA auszuschließen, wurden die Kernextrakte vor der Präzipitation mit DNA und RNA spezifischer Nuklease (Benzonase) behandelt. Im Vergleich zu unbehandelten Extrakten blieb das kopräzipitierte PE38 bzw. DBP Signal auch nach Nukleasebehandlung unverändert (Abb. 18, Spur 7,8, Abb. 18, Spur 11,12). Obwohl eine unspezifische Kopräzipitation über DNA oder RNA nach diesem Ergebnis unwahrscheinlich war, wurden

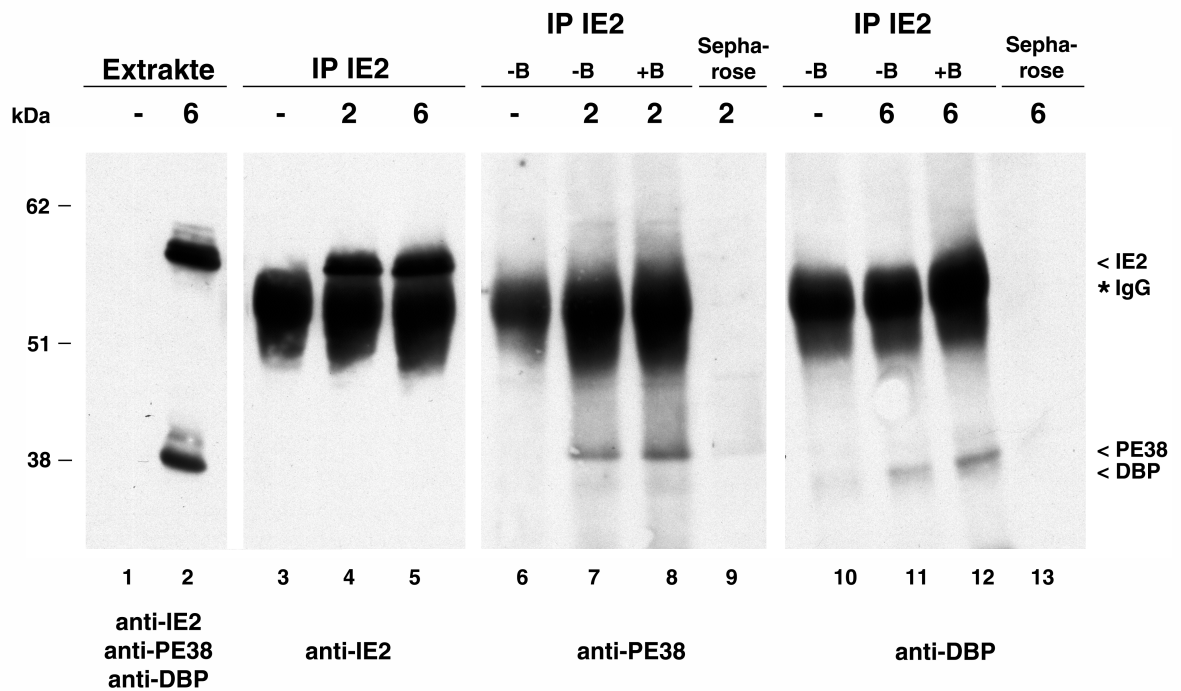


Abb. 18: Allgemeine Kontrollexperimente zur IE2 Immunpräzipitation

TN-368 Zellen wurden mit wt AcMNPV Virus infiziert und Kernextrakte aus uninfizierten (-) und infizierten Zellen 2 und 6 h p.i. präpariert. Anschließend wurde ein Teil der Extrakte mit Benzonase (+B) behandelt (Spur 8, 12). Zur Präzipitation mit anti-IE2 Sepharose (Spur 3-5, 6-8, 10-12) bzw. ungekoppelter Sepharose (Spur 9, 13) wurden je 150 µg der Kernextrakte eingesetzt. Die Präzipitate wurden zusammen mit je 75 µg der unpräzipitierten Extrakte (Spur 1, 2) auf 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Zum Nachweis von IE2 (Spur 3-5), PE38 (Spur 6-9) und DBP (Spur 10-13) wurden polyklonale anti-IE2, anti-PE38 oder anti-DBP Kaninchenseren verwendet. Zur Kontrolle der Signalspezifität wurden unpräzipitierte Extrakte mit einem Antikörpergemisch der drei Kaninchenseren inkubiert (Spur 1, 2). Die Pfeile markieren die IE2, PE38 und DBP spezifischen Signale und die IgG Bande der zur Präzipitation eingesetzten Antikörper ist mit einem Stern markiert. Die Proteinstandards sind links aufgeführt.

die Extrakte routinemäßig vor allen Präzipitationen mit Nuklease behandelt. Die Antikörpersignale der Immunpräzipitationen wurden immer mit Signalen aus unpräzipitierten Extrakten verglichen, um die Antikörperspezifität nach der Immunpräzipitation zu überprüfen (Abb. 18, Spur 1,2).

Die oben aufgeführten Kontrollen zeigten eine spezifische Kopräzipitation von PE38 und IE2 2 und 6 h p.i. Außerdem war die Kopräzipitation von IE2 und DBP 6 h p.i. spezifisch.

9.2.2 Kontrolle der DBP bzw. PE38 Kopräzipitation in der späten und sehr späten Phase der Infektion

Die Präzipitation von IE2 nahm aufgrund der reduzierten IE2 Expressionsrate 24 h p.i. im Vergleich zu 8 h p.i. oder 6 h p.i. stark ab (Abb. 19 E, Spur 11,12, Abb. 18, Spur 5). Da 24 h p.i. weniger IE2 Antigen zur Präzipitation zur Verfügung stand, müßten die Signale für DBP 24 h p.i. nachlassen, während für PE38 kein spezifisches Signal mehr auftreten dürfte, da PE38 zu diesem Zeitpunkt nur noch schwach mit Hilfe der Westernblot Technik nachzuweisen ist (Krappa et al., 1995). Zu diesem Zeitpunkt konnte tatsächlich nur noch wenig bzw. kein PE38 kopräzipitiert werden (Abb. 19 C, Spur 4, Abb. 19 F, Spur 18), allerdings verstärkte sich die DBP Kopräzipitation gegenüber 6 und 8 h p.i. (Abb. 19 A, Spur 4). Im Zellkern befanden sich 24 h p.i. große Mengen an viraler DNA und das DNA bindende Protein DBP könnte über eine unspezifische Wechselwirkung der DNA mit Sepharose präzipitiert werden. Allerdings konnte die Verdopplung der Nukleasekonzentration oder die Präinkubation der Extrakte mit ungekoppelter Sepharose die Kopräzipitation von DBP aus Extrakten 24 h p.i. nicht verringern (Abb. 19 A, Spur 7, Abb. 19 B, Spur 12). Damit war die DBP Kopräzipitation 24 h p.i. unspezifisch. Im Vergleich dazu zeigte die Verdopplung der Nukleasekonzentration auf die Signalstärke des Kopräzipitats 8 h p.i. Einfluß, denn das Signal nahm nach der Inkubation leicht ab und könnte für die unspezifische Präzipitation von DBP über die DNA sprechen. (Abb. 19 A, Spur 3,6). Dagegen zeigte die Präinkubation mit Sepharose kaum Einfluß auf die DBP Kopräzipitation 8 h p.i. (Abb. 19 B, Spur 11).

Für die Kopräzipitation von PE38 ergaben alle oben aufgeführten Kontrollen 24 h p.i. keine bzw. extrem schwache Signale (Abb. 19 C, Spur 4,7, Abb. 19 D, Spur 12). Zu diesem Zeitpunkt war kaum mehr PE38 im Zellkern vorhanden und das PE38 Antiserum sollte ein

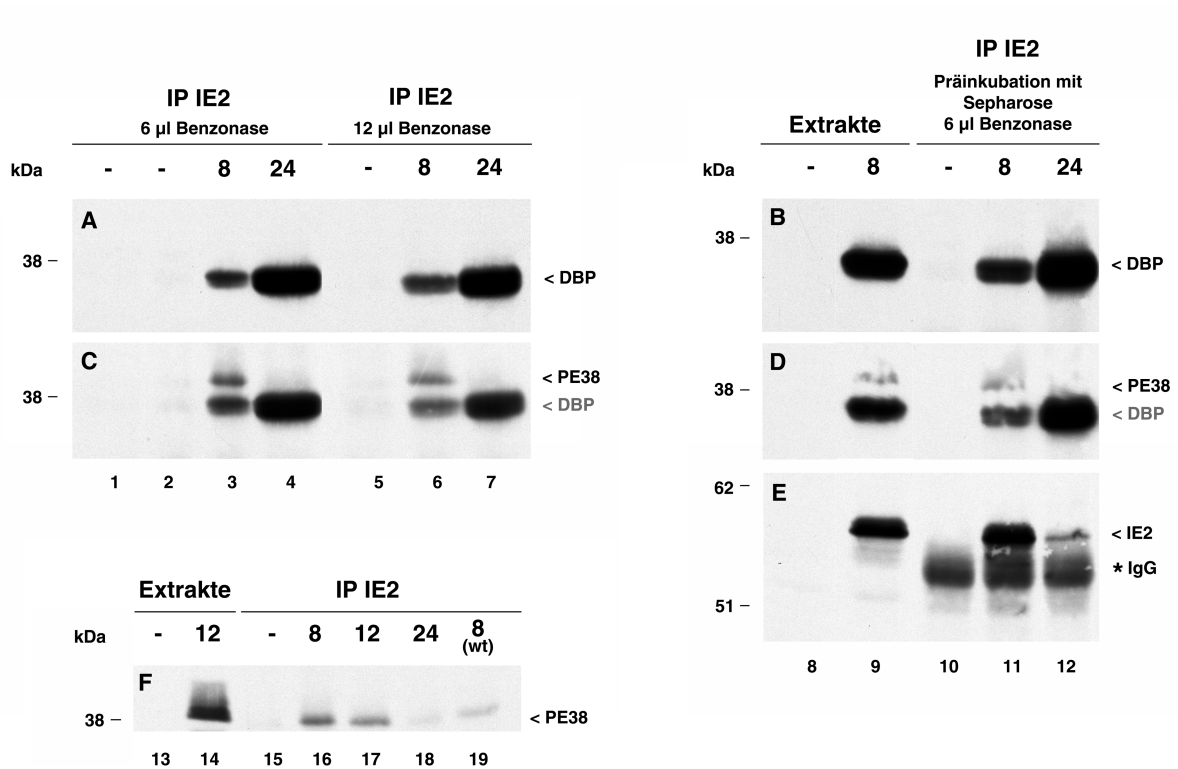


Abb. 19: Kontrolleexperimente zur DBP bzw. PE38 Kopräzipitation in der späten Phase und sehr späten Phase der Infektion

TN-368 Zellen wurden mit dem rekombinanten Virus AcMNPV-PML/e infiziert und Kernextrakte aus uninfizierten (-) und infizierten Zellen 8, 12 und 24 h p.i. präpariert. Außerdem wurden Kernextrakte aus wt AcMNPV Virus infizierten Zellen 8 h p.i. präpariert. Ein Teil der Kernextrakte (150 µg) wurde vor der Inkubation mit anti-IE2 Sepharose standardmäßig mit 6 µl Benzonase inkubiert (Spur 1-4, 15-19). Daneben wurden Kernextrakte (150 µg) mit 12 µl Benzonase behandelt (Spur 5-7) oder vor der Inkubation mit 6 µl Benzonase für 30 min mit ungekoppelter Sepharose präinkubiert (Spur 10-12). Nach der Präzipitation der IE2 Komplexe wurden die Proteine zusammen mit 75 µg unpräzipitierten Kernextrakten auf 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt (Spur 8, 9, 13, 14). IE2, PE38 und DBP wurden mit den entsprechenden polyklonalen Kaninchen-Antisera nachgewiesen. Dabei wurden die Membranen in A und B zunächst mit anti-DBP Kaninchenserum inkubiert und anschließend mit anti-PE38 Kaninchenserum behandelt (C, D). Die Membran B wurde zur Kontrolle der IE2 Immunpräzipitation ein drittes Mal mit anti-IE2 Kaninchenserum inkubiert (E). PE38 wurde in F mit anti-PE38 Kaninchenserum nachgewiesen. Die Pfeile markieren die IE2, PE38 und DBP spezifischen Signale und die IgG Bande der zur Präzipitation eingesetzten Antikörper ist mit einem Stern markiert. Die Proteinstandards sind jeweils links aufgeführt.

etwa 20 kDa großes Protein im Zytoplasma der infizierten Zellen erkennen (Krappa et al., 1995). Deshalb wurden zur Prüfung der IE2/PE38 Kopräzipitation später als 6 h p.i. neben dem Zeitwert 24 h p.i. die Zeitwerte 8 und 12 h p.i. ausgewählt, zu denen sowohl IE2 als auch PE38 im Kern zeitgleich exprimiert wurden. Aus infizierten Kernextrakten konnte PE38 sowohl 8 h p.i. als auch 12 h p.i. mit anti-IE2 Sepharose kopräzipitiert werden (Abb. 19 F, Spur 16,17,19). Dagegen war ein PE38 Signal 24 h p.i. nur sehr schwach nachzuweisen (Abb. 19 F, Spur 18). Weder die Behandlung der Extrakte mit einer erhöhten Nukleasekonzentration noch die Präinkubation der Extrakte mit Sepharose zeigte Einfluß auf die Kopräzipitation von IE2 und PE38 8 h p.i. (Abb. 19 C, Spur 3,6, Abb. 19 D, Spur 11). Außerdem war die Umstrukturierung der IE2 Lokalisierung 12 h p.i. für die Kopräzipitation ohne Bedeutung. Daneben spielte es für die Kopräzipitation von PE38 keine Rolle, ob die Extrakte aus wt Virus oder AcMNPV-PML/e infizierten Zellen präpariert wurden (Abb. 19 F, Spur 16,19).

PE38 wurde mit anti-IE2 Sepharose ab 2 h p.i. bis 12 h p.i. aus Kernextrakten infizierter Zellen kopräzipitiert. Um die Signifikanz dieser Kopräzipitation zu verifizieren, wurde die Immunpräzipitation in umgekehrter Richtung durchgeführt und an Sepharose gekoppeltes PE38 Antiserum zur Präzipitation eingesetzt. Dazu wurden Kernextrakte, die 0, 8 und 24 h p.i. präpariert wurden, mit anti-PE38 Sepharose präzipitiert. Zur Kontrolle der Spezifität der anti-PE38 Sepharose wurde die Membran mit PE38 Antiserum immungefärbt. Die Sepharose konnte PE38 8 h p.i. aus den Extrakten präzipitieren, dagegen war 24 h p.i. kaum mehr PE38 nachzuweisen (Abb. 20, Spur 4,5). Die Präzipitation uninfizierter Zellen ergab kein PE38 Signal (Abb. 20, Spur 3). Wurde eine Antikörperfärbung mit IE2 Antiserum durchgeführt, kopräzipitierte IE2 8 h p.i. wie erwartet mit PE38 Komplexen (Abb. 20, Spur 4). 24 h p.i. wurde kein IE2 kopräzipitiert, da zu diesem Zeitpunkt das PE38 Antigen in den Kernextrakten fast fehlte (Abb. 20, Spur 5). Die Signale nach der Präzipitation korrelierten mit den PE38 bzw. IE2 Signalen aus Kernextrakten 8 h p.i. (Abb. 20, Spur 2).

Eine Antikörperfärbung der PE38 Immunpräzipitation mit DBP Antiserum wies die Kopräzipitation von DBP sowohl 8 als auch 24 h p.i. mit zunehmendem Signal nach (Abb. 20, Spur 4,5). Dieses Ergebnis zeigte, daß die Kopräzipitation von DBP 24 h p.i. nach Inkubation mit PE38 Antiserum unspezifisch war. Zusammen mit den Ergebnissen der IE2 Immunpräzipitation wurde die Beobachtung unterstützt, daß das Protein DBP 24 h p.i. und wahrscheinlich auch 8 h p.i. unspezifisch präzipitiert wurde. Aufgrund der Sepharose

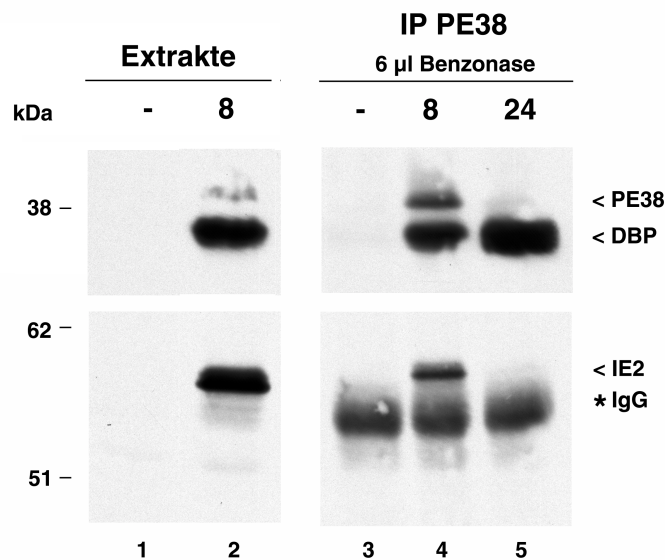


Abb. 20: PE38 Immunpräzipitation im Infektionsverlauf

TN-368 Zellen wurden mit dem rekombinanten Virus AcMNPV-PML/e infiziert und Kernextrakte aus uninfizierten (-) und infizierten Zellen 8 und 24 h p.i. präpariert. Nach der Behandlung der Kernextrakte mit Benzonase wurden 150 µg Extrakt zur Präzipitation mit anti-PE38 Sepharose eingesetzt und die präzipitierten Proteine wurden auf einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zum Nachweis von DBP erfolgte eine Inkubation mit polyklonalem anti-DBP Kaninchenserum und zum Nachweis von PE38 eine Zweitinkubation mit polyklonalem anti-PE38 Kaninchenserum (Spur 3-5). Nach mehrmaligem Waschen wurde IE2 mit polyklonalem anti-IE2 Kaninchenserum nachgewiesen (Spur 3-5). Zur Kontrolle der Signalspezifität wurden Kernextrakte (75 µg) aus uninfizierten Zellen und aus Zellen 8 h p.i. mit den jeweiligen Antisera inkubiert (Spur 1, 2). Die Pfeile markieren die IE2, PE38 und DBP spezifischen Signale und die IgG Bande der zur Präzipitation eingesetzten Antikörper ist mit einem Stern markiert. Die Proteinstandards sind jeweils links aufgeführt.

Kontrolle, die keine DBP Präzipitation aus Kernextrakten 6 h p.i. zeigte, war mit großer Sicherheit die Koimmunpräzipitation von IE2 und DBP 6 h p.i. spezifisch. Möglicherweise verfügte der Zellkern 6 h p.i. über DBP Konzentrationen und DNA Konzentrationen, die eine spezifische Kopräzipitation von DBP zuließen. Diese nahm jedoch mit zunehmender DBP Menge und zunehmender Kopienzahl der viralen DNA ab.

Dagegen korrelierte der Nachweis von IE2 nach Präzipitation mit PE38 Antiserum 8 h p.i. mit den Ergebnissen der IE2 Immunpräzipitationen, die PE38 2, 6, 8 und 12 h p.i. als Assoziationspartner gemeinsamer Komplexe zeigten, und bestätigte die Spezifität der IE2/PE38 Wechselwirkung.

10. Untersuchung zur Kopräzipitation von PML und IE2

Offensichtliche Kandidaten für eine Kopräzipitation waren IE2 und PML, die in Immunfluoreszenzstudien 4 und 8 h p.i. in gemeinsamen Kerndomänen lokalisierten. Deshalb wurden Kernextrakte aus uninfizierten und infizierten Zellen, die mit der Rekombinante AcMNPV-PML/e infiziert wurden, 8, 12, und 24 h p.i. präpariert und mit anti-IE2 Sepharose präzipitiert. Nach dem Transfer wurde mit Hilfe von IE2 Antiserum gezeigt, daß IE2 aus den Extrakten isoliert wurde (Abb. 21, Spur 1-6). Eine Immunfärbung der Nitrozellulosemembran mit monoklonalem PML spezifischen Antikörpern erkannte jedoch nur Antigen in den zur Kontrolle aufgetragenen Zellkernextrakten 12 h p.i. (Abb. 21, Spur 7-12). Ein Protein der Größenordnung 90 kDa wurde wie erwartet nachgewiesen (Abb. 21, Spur 8). Weder aus Extrakten der Zeitwerte 8 noch 12 noch 24 h p.i. konnte PML zusammen mit IE2 präzipitiert werden (Abb. 21, Spur 10-12).

Entgegen den Erwartungen aus Ergebnissen der Immunfluoreszenzstudien wurde eine Kopräzipitation von IE2 und PML im Infektionsverlauf nicht nachgewiesen. Möglicherweise benötigte diese Kopräzipitation aufgrund der Assoziation von PML mit der Kernmatrix besondere Reaktionsbedingungen.

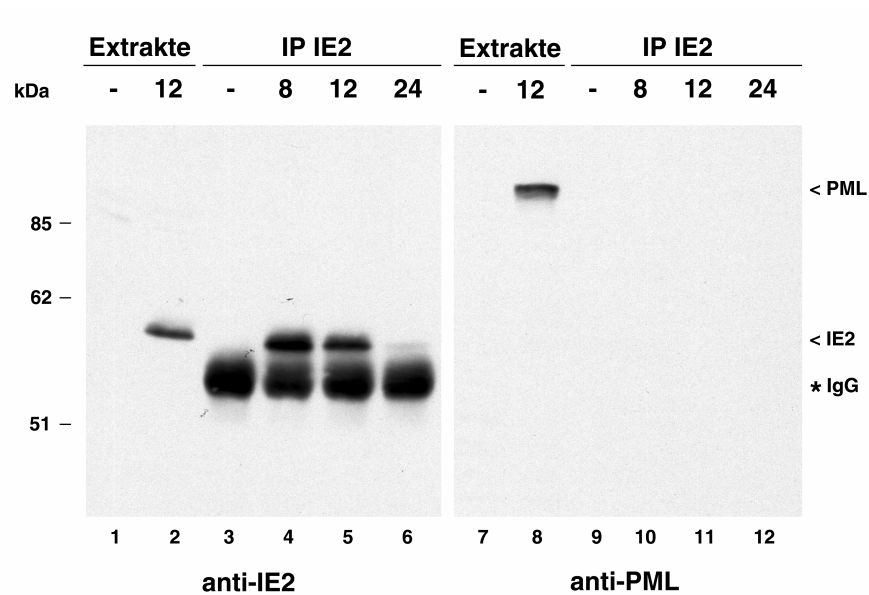


Abb. 21: Untersuchung zur Kopräzipitation von PML und IE2

TN-368 Zellen wurden mit dem rekombinanten Virus AcMNPV-PML/e infiziert und Kernextrakte aus uninfizierten Zellen (-) und Zellen 8, 12 und 24 h p.i. präpariert. Nach der Behandlung der Kernextrakte (150 μ g) mit anti-IE2 Sepharose wurden die präzipitierten Proteine (Spur 3-6, 9-12) zusammen mit unpräzipitierten Extrakten (75 μ g) (Spur 1, 2, 7, 8) auf einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zur Kontrolle der Spezifität der Immunpräzipitation wurde eine Hälfte der Membran mit polyklonalem anti-IE2 Kaninchenserum inkubiert (Spur 1-6). Zum Nachweis von PML wurde mAB5E10 eingesetzt (Spur 7-12).

11. Assoziation von IE2 mit funktionellen Kerndomänen im Infektionsverlauf

Immunfluoreszenzstudien des IE2 Proteins im Infektionsverlauf sowie Immunpräzipitationen zeigten die Assoziation von IE2 mit dem DNA bindenden Protein DBP in gemeinsamen Kernkomplexen. Außerdem wurde die Kolokalisierung von IE2 und PML, das möglicherweise insektenzellspezifische PODs markierte, im Infektionsverlauf beschrieben. In BrdU-Pulsmarkierungsexperimenten kolokalisierte DBP mit Orten viraler Replikation (Okano et al., 1999). Eine unmittelbare Nähe von viralen Replikationskompartimenten und PODs wurde bereits für einige säugerspezifische Viren beschrieben (Maul, 1998; Maul et al., 1996). Ob die Assoziation von IE2 mit DBP und PML ein Hinweis auf eine mögliche Assoziation von IE2 mit funktionellen Kerndomänen, wie beispielsweise viralen Replikationszentren, darstellte, war bisher unklar. Deswegen wurden virale Replikationszentren mit Hilfe von BrdU markiert und mit der Lokalisierung der IE2 Domänen vergleichend betrachtet.

11.1 Markierung viraler Replikationszentren mit BrdU

Zur Markierung sich replizierender DNA Bereiche wurde die Thymidin analoge Verbindung BrdU verwendet. Sie wurde dem Zellmedium kurz vor der Zellfixierung zugegeben, so daß DNA Synthese betreibende Zellen BrdU anstelle von Thymidin einbauten. Mit einem BrdU spezifischen monoklonalen Antikörper konnten nach Behandlung der DNA mit denaturierender Natronlauge sich replizierende Bereiche des zellulären bzw. viralen Genoms sichtbar gemacht werden. Zur Kontrolle wurden unmarkierte Populationen von uninfizierten Zellen und von Zellen 8 h p.i. untersucht. Sie zeigten nach Immunfärbung mit BrdU Antikörper kein Signal (Abb. 22 A, B). Im Vergleich dazu konnte in BrdU markierten Zellen, sowohl in uninfizierten als auch in Zellen 8 h p.i. Replikation nachgewiesen werden. Die in der S-Phase befindlichen uninfizierten Zellen zeigten viele kleine Orte zellulärer Replikation im Kern (Abb. 22 C). Diese machten ca. 10-30% der gesamten Zellpopulation aus. Das Muster der zellulären Replikationszentren der Insektenzellen hatte große Ähnlichkeit mit dem anderer markierter Zellkulturen (de Bruyn Kops und Knipe, 1988; Nakamura et al., 1986). Im Gegensatz dazu zeigten BrdU markierte infizierte Zellen 8 h p.i. große Replikationszentren, die sich über den gesamten Kern verteilten und sich deutlich von Replikationszentren uninfizierter Zellen unterschieden (Abb. 22 D). Sie ähnelten stark den DBP oder LEF-3 Domänen der Fluoreszenzstudien. Okano et al. (1999) beschrieben in ihrem Bericht zur Kolokalisierung von IE1, DBP und LEF-3 mit viralen Replikationszentren ähnliche

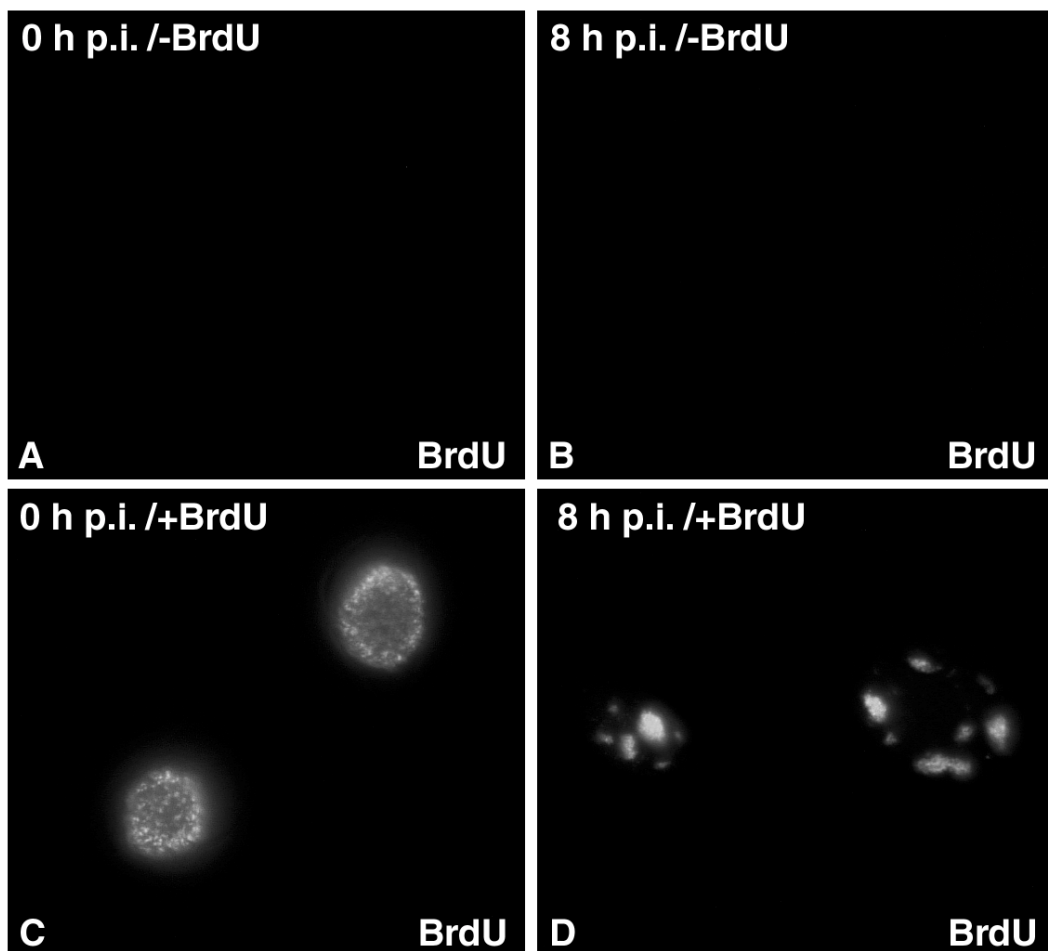


Abb. 22: Analyse der BrdU Markierung infizierter und uninfizierter TN-368 Zellen.

TN-368 Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät und mit wt AcMNPV Virus infiziert. Eine Stunde vor der Fixierung in 2% Paraformaldehyd wurde das Zellmedium uninfizierter Zellen (C) und infizierter Zellen (D) durch ein BrdU-haltiges Zellmedium (50 μ M) ersetzt. Außerdem wurden unbehandelte uninfizierte (A) bzw. unbehandelte infizierte Zellen 8 h p.i. (B) in 2% Paraformaldehyd fixiert. Zum Nachweis von BrdU wurden die Zellen mit monoklonalem BrdU Antikörper (Maus) und FITC-gekoppelten Antikörpern inkubiert. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe des Zeiss Mikroskops Axiovert 135 und einem digitalen Kamerasystem der Firma Intas angefertigt.

Immunfluoreszenzstudien der Baculovirusreplikation. Interessant war, daß sich virale Replikationszentren leichter markieren ließen als zelluläre. Möglicherweise verlief der Einbau von BrdU in das virale Genom mit höherer Frequenz, so daß die Sensitivität des BrdU Antikörpers für die Erkennung der zellulären Replikation eine Rolle spielen könnte.

Die BrdU-Pulsmarkierungsexperimente konnten virale Replikationszentren 8 h p.i. nachweisen. Sie unterschieden sich durch ihre Größe und ihre geringere Anzahl von zellulären Replikationszentren uninfizierter Zellen.

11.2 Kolokalisierung von IE2 mit Orten viraler Replikation im Infektionsverlauf

Um zu untersuchen, ob IE2 mit Orten aktiver viraler Replikation assoziierte, wurden Zellen AcMNPV infiziert und kurz vor der Fixierung mit BrdU markiert. Außerdem wurden uninfizierte, unmarkierte Zellen untersucht (Abb. 23 A). Ab 4 h p.i. begannen einzelne Zellen mit der Replikation des viralen Genoms und konnten mit BrdU markiert werden (Abb. 23 B). Eine Kofärbung dieser Zellen mit IE2 und BrdU Antikörpern zeigte im Gegensatz zu uninfizierten, unmarkierten Zellen die Kolokalisierung einiger nukleärer IE2 Domänen mit distinkten viralen Replikationszentren (Abb. 23 B). Zwei Stunden später begann bereits ein größerer Anteil der infizierten Zellen das virale Genom zu replizieren, und die konfokale mikroskopische Analyse dieser Zellen zeigte nach Überlagerung der IE2 und BrdU Signale die Kolokalisierung von IE2 mit Orten aktiver viraler Replikation (Abb. 23 C). In der Regel zeigten die Zellen mehr IE2 Domänen als Replikationszentren, so daß immer IE2 Domänen ohne Assoziation mit BrdU markierten Domänen beobachtet wurden. Ab 8 h p.i. nahmen die viralen Replikationszentren an Größe zu, so daß sie in den meisten Zellen einen Großraum des Kerns einnahmen. IE2 wurde immer noch in Assoziation mit viraler Replikation beobachtet, lokalisierte aber auch außerhalb der Replikationszentren (Abb. 23 D).

Diese Studien zeigten zum ersten Mal die Assoziation der IE2 Domänen mit funktionellen virusinduzierten Replikationszentren in der frühen Phase der Replikation. Diese Ergebnisse korrelierten mit den Fluoreszenzstudien infizierter Zellen, die eine Assoziation von IE2 Domänen mit DBP oder LEF-3 früh im Infektionsverlauf zeigten.

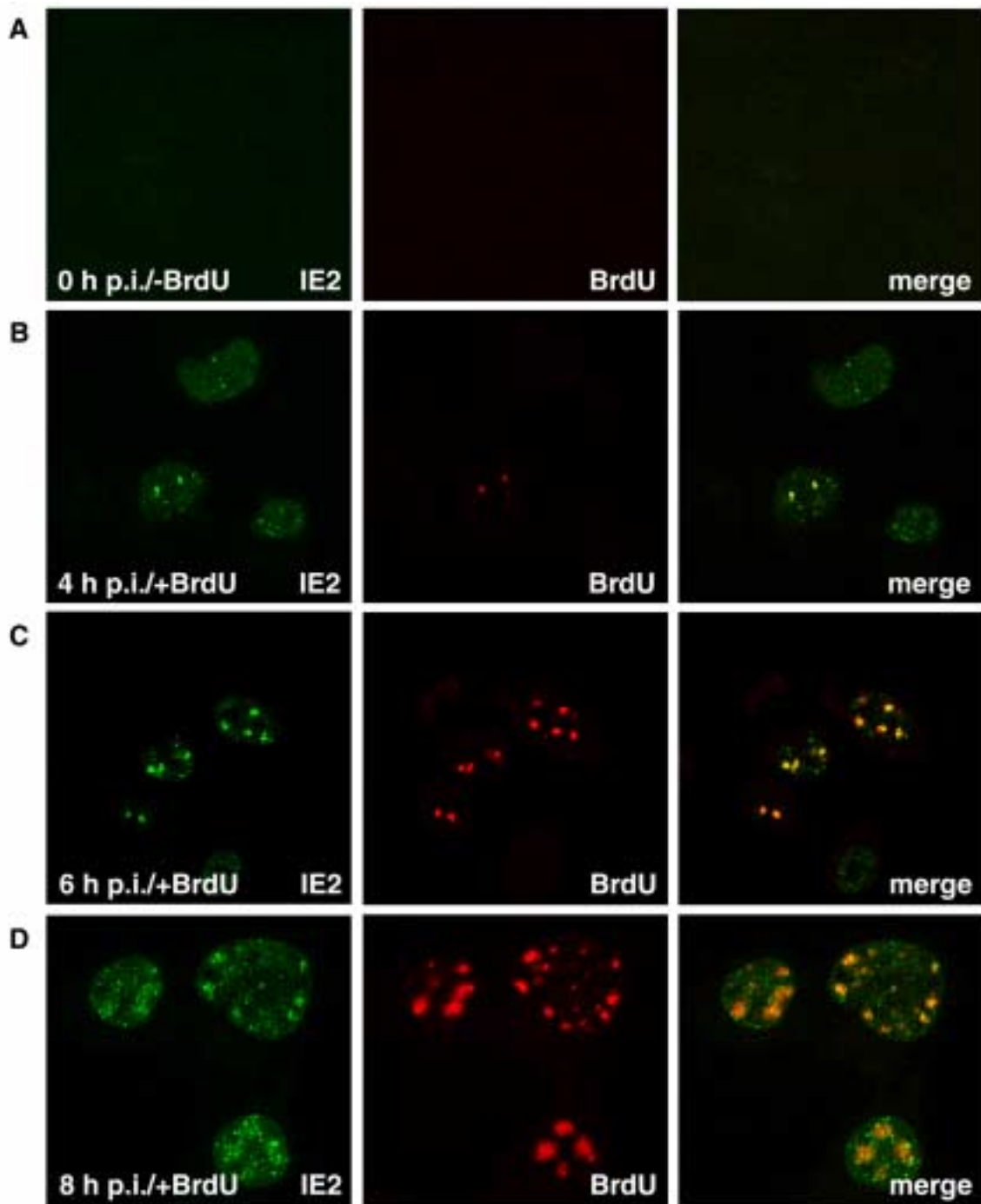


Abb. 23: Kolokalisierung von IE2 mit BrdU markierten Replikationszentren

TN-368 Zellen wurden mit wt AcMNPV Virus infiziert und eine Stunde vor der Fixierung mit BrdU markiert (B-D). Die infizierten, BrdU markierten Zellen wurden 4, 6 und 8 h p.i. (B-D) zusammen mit uninfizierten, unmarkierten Zellen (A) in 2% Paraformaldehyd fixiert. Zum Nachweis von IE2 wurden die Zellen mit polyklonalem anti-IE2 Kaninchenserum und zum Nachweis von BrdU mit monoklonalem BrdU Antikörper (Maus) inkubiert. IE2 wurde mit FITC-gekoppelten Antikörpern (grün) und BrdU mit Cy3-gekoppelten Antikörpern (rot) sichtbar gemacht. Die Überlagerungen der Signale einer Zelle sind rechts dargestellt. Dabei zeigen gelbe Signale Kolokalisierung an. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskopsystems der Firma Leica angefertigt.

11.3 Kolokalisierung von DBP mit viralen Replikationszentren

Daß DBP mit viralen Replikationszentren assoziierte, wurde bereits beschrieben (Okano et al., 1999). Zur Kontrolle der BrdU-Pulsmarkierungsexperimente wurde die Kolokalisierung von DBP mit BrdU markierten Replikationszentren untersucht. Dazu wurden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Replikation betrachtet, die beginnende virale Replikation 6 h p.i. und fortgeschrittene Replikation 10 h p.i. demonstrierten. Die Kofärbung mit DBP und BrdU Antikörpern zeigte die Kolokalisierung von DBP und BrdU Signalen sowohl 6 als auch 10 h p.i. (Abb. 24). Uninfizierte, unmarkierte Zellen zeigten weder Signale für DBP noch für BrdU. Ein entscheidender Unterschied zwischen frühen und späten Replikationszentren war ihre Größe. Während 6 h p.i. in der Mehrzahl der Zellen 5-10 kleine distinkte Replikationszentren beobachtet wurden (Abb. 24 A), zeigten die meisten Zellen 10 h p.i. fast im gesamten Zellkern DNA Replikation (Abb. 24 B). Da die Infektion nicht synchron ablief, konnte sowohl 6 h p.i. in wenigen Zellen fortgeschrittene virale Replikation als auch 10 h p.i. beginnende virale Replikation einiger Zellen nachgewiesen werden (Abb. 24 A, B).

Die Kolokalisierung von DBP und BrdU markierten Zentren 6 und 10 h p.i. wies DBP im Gegensatz zu IE2 als permanente Komponente viraler Replikationszentren aus und korrelierte mit publizierten Ergebnissen (Okano et al., 1999).

12. Lokalisierung von PML in Relation zu frühen viralen Replikationszentren

IE2 Immunfluoreszenzstudien zeigten die Assoziation von IE2 Domänen sowohl mit der potentiellen zellulären Komponente PML als auch mit funktioneller viraler Replikation. Demnach könnte PML über IE2 auch mit viraler Replikation assoziieren.

Um diese Frage zu klären, wurde die Lokalisierung von PML in Relation zu frühen viralen Replikationszentren untersucht. In AcMNPV-PML/e infizierten Zellen, die sowohl PML als auch Replikation des viralen Genoms zeigten, war 6 h p.i. die Überlagerung von PML Domänen mit kleinen viralen Replikationszentren selten (Abb. 25 A). Selbst größere Replikationszentren wiesen kaum Kolokalisierung von PML und BrdU Signalen auf

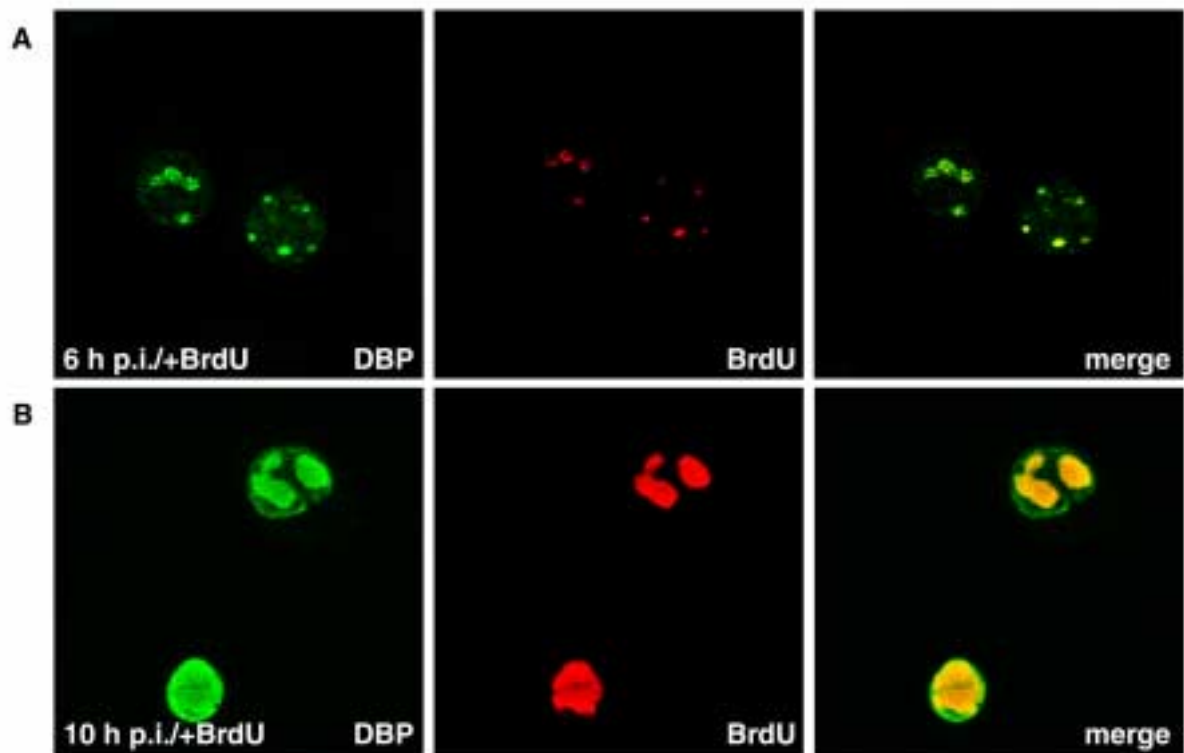


Abb. 24: Kolokalisierung von DBP mit BrdU markierten Replikationszentren

TN-368 Zellen wurden mit wt AcMNPV infiziert und eine Stunde vor der Fixierung mit BrdU markiert (A, B). Die Fixierung der Zellen erfolgte 6 und 10 h p.i. in 2% Paraformaldehyd. DBP wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit polyklonalem anti-DBP Kaninchenserum und BrdU mit monoklonalem BrdU Antikörper (Maus) nachgewiesen. Dabei wurde DBP mit FITC-gekoppelten Antikörpern (grün) und BrdU mit Cy3-gekoppelten Antikörpern (rot) sichtbar gemacht. Die Überlagerungen der Signale einer Zelle sind rechts dargestellt. Dabei zeigen gelbe Signale Kolokalisierung an. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskopsystems der Firma Leica angefertigt.

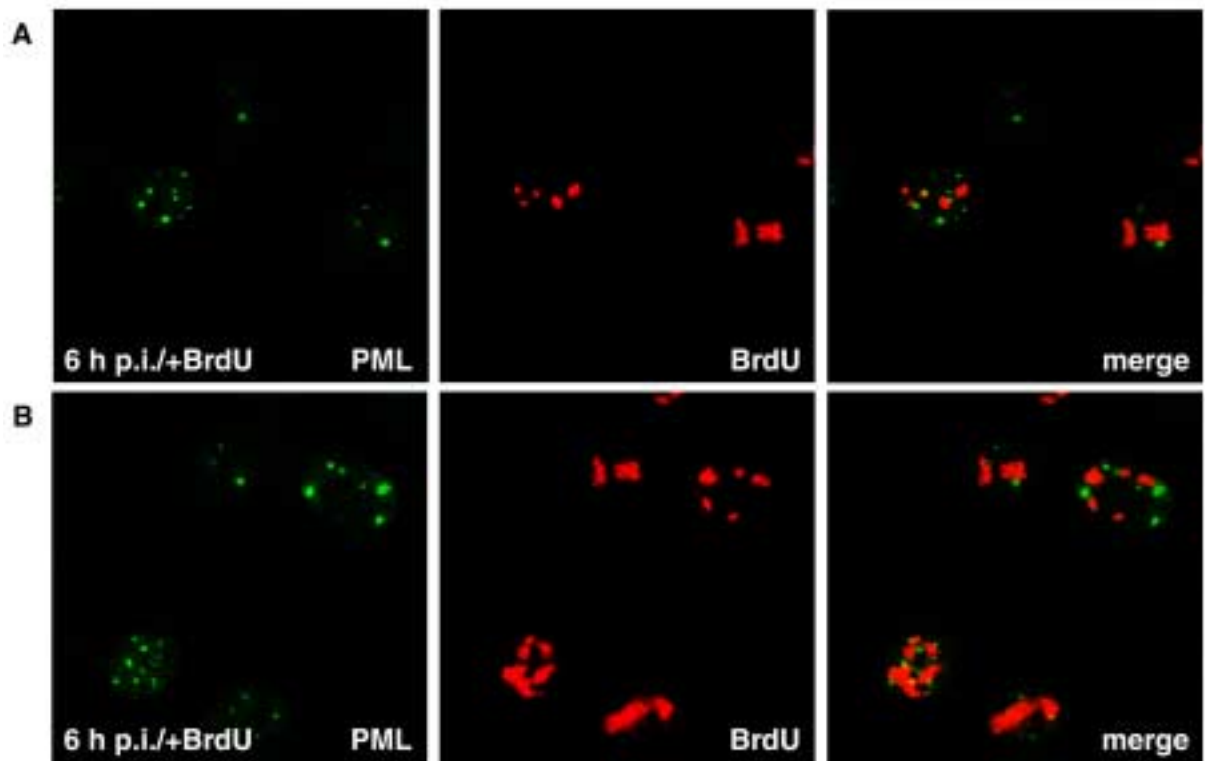


Abb. 25: Analyse der PML Lokalisierung in Relation zu frühen BrdU markierten Replikationszentren.

TN-368 Zellen wurden mit dem rekombinanten Virus AcMNPV-PML/e infiziert und 6 h p.i. in 2% Paraformaldehyd fixiert. Vor der Fixierung wurden die Zellen eine Stunde in BrdU-haltigem Zellmedium (50 μ M) inkubiert (A, B). PML wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit polyklonalem anti-PML Kaninchenserum und BrdU mit monoklonalem BrdU Antikörper (Maus) nachgewiesen. Dabei wurde PML mit FITC-gekoppelten Antikörpern (grün) und BrdU mit Cy3-gekoppelten Antikörpern (rot) sichtbar gemacht. Die Überlagerungen der Signale einer Zelle sind rechts dargestellt. Dabei zeigen gelbe Signale Kolokalisierung an. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskopsystems der Firma Leica angefertigt.

(Abb. 25 A, B). PML lokalisierte vielmehr am Rand oder in nächster Nähe der Replikationszentren (Abb. 25 A, B).

Im Gegensatz zu IE2 kolokalisierte PML sehr selten mit BrdU markierter viraler Replikation, befand sich aber in direkter Nachbarschaft der Virusreplikation, so daß eine Wechselwirkung zwischen potentiellen zellulären PML Domänen und viraler Replikation nicht vollkommen auszuschließen ist.

13. Untersuchungen zur Interaktion von PML und endogenem SUMO der Insektenzelle

In den vorangegangenen Studien wurde zur Markierung potentieller homologer PML Domänen der Insektenzelle eine humane Variante des PML Proteins exprimiert. Ein Charakteristikum der PODs in Säugerzellen ist die kovalente Bindung der PML Komponente an SUMO-1 (Sternsdorf et al., 1997b; Müller et al., 1998). Vor kurzem wurde das *Drosophila* Homolog dSmt3 des säugerzellspezifischen SUMO-1 beschrieben. Das Protein dSmt3 ist in der Lage, humanes PML, das transient in *Drosophila* Zellen exprimiert wurde, zu konjugieren (Lehembre et al., 2000). Um zu prüfen, ob die PML markierten Domänen der Insektenzelllinie TN-368 mit konservierten Modifizierungsmechanismen interagieren, wurde die mögliche Assoziation von PML mit SUMO nach Transfektion und im Infektionsverlauf untersucht.

13.1 Kolokalisierung von PML und SUMO nach Transfektion und im Infektionsverlauf

Zur transienten Expression von PML wurden TN-368 Zellen mit dem Plasmid pe38PML-HR1 transfiziert. Zur Kontrolle wurden Zellen, die mit dem Plasmid pBS transfiziert wurden, untersucht. Nach Immunfärbung pBS transfizierter Zellen mit dSmt3 spezifischem Antikörper (Lehembre et al., 2000) wurde im Gegensatz zur Färbung mit Präimmenserum die Lokalisierung von endogenem SUMO nachgewiesen (Abb. 26 A, B). SUMO zeigte hauptsächlich eine diffuse Lokalisierung im Zellkern, die in manchen Zellen mit feinen Domänen versehen war (Abb. 26 A). Meist lokalisierten diese Domänen in der Randregion des Zellkerns. Ein ähnliches Muster wurde für das dSmt3 Protein aus *Drosophila* beschrieben (Lehembre et al., 2000). Nach der Transfektion von pe38PML-HR1 veränderte sich die

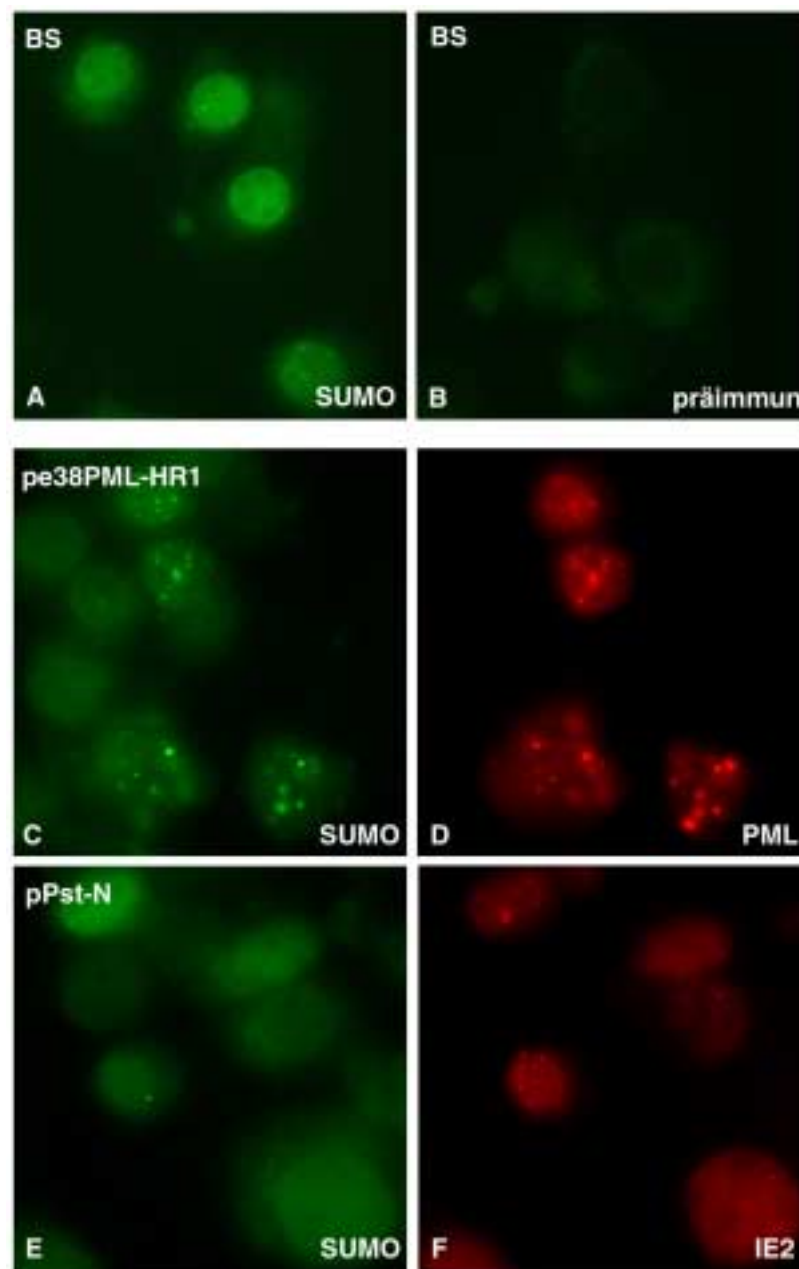


Abb. 26: Lokalisierung des endogenen Proteins SUMO nach Transfektion der Zelllinie TN-368

TN-368 Zellen wurden mit den Plasmiden pBS (A, B), pe38PML-HR1 (C, D) oder pPst-N (Abb. 1) (E, F) transfiziert und 48 Stunden nach der Transfektion in 2% Paraformaldehyd fixiert. Zum Nachweis von endogenem SUMO wurden die Zellen mit polyklonalem anti-dSmt3 Kaninchenserum inkubiert (A, C, E). Bei der Doppelfärbung wurde zum Nachweis von IE2 polyklonales anti-IE2 Mausserum (F) und zum Nachweis von PML mAB5E10 (D) verwendet. Zur Spezifitätskontrolle des polyklonalen anti-dSmt3 Kaninchenserums wurden pBS transfizierte Zellen sowohl mit Präimmunsereum (B) als auch mit anti-dSmt3 Kaninchenserum (A) behandelt. SUMO wurde mit FITC-gekoppelten Antikörpern (grün) und IE2 und PML mit Cy3-gekoppelten Antikörpern (rot) nachgewiesen. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe des Zeiss Mikroskops Axiovert 135 und einem digitalen Kamerasystem der Firma Intas angefertigt.

SUMO Lokalisierung der transfizierten Zellen. Die Kofärbung PML exprimierender Zellen mit PML Antikörper und dSmt3 Antiserum zeigte im Vergleich zu pBS transfizierten Zellen keine diffuse SUMO Lokalisierung, sondern SUMO lokalisierte in nukleären Domänen des Zellkerns (Abb. 26 C). Die Lokalisierung von PML zeigte wie erwartet nukleäre Domänen (Abb. 26 D) und ähnelte stark dem SUMO Muster (Abb. 26 C, D). Die konfokale Analyse PML exprimierender Zellen ergab die vollständige Kolo-kalisierung von PML und SUMO Signalen (Abb. 27 A). Im Gegensatz dazu veränderte die transiente Expression von IE2 die SUMO Lokalisierung nicht, und die SUMO Lokalisierung IE2 exprimierender Zellen korrelierte mit der SUMO Verteilung pBS transfizierter Zellen (Abb. 26 E, F).

Neben den Transfektionsstudien wurde auch die Kolo-kalisierung von SUMO und PML früh und spät im Infektionsverlauf untersucht. TN-368 Zellen wurden mit der Rekombinante AcMNPV-PML/e infiziert und 4 und 16 h p.i. mit Antikörpern gegen PML und SUMO gefärbt. Sowohl 4 als auch 16 h p.i. kolo-kalisierten PML und SUMO in gemeinsamen Domänen (Abb. 27 B). Dabei zeigte SUMO eine konforme Umstrukturierung mit PML in der späten Phase der Infektion. Die Anzahl der SUMO Domänen nahm 16 h p.i. ab, und eine diffuse SUMO Lokalisierung trat in den Vordergrund.

Diese Studien zeigten, daß transient exprimiertes PML das Potential besaß, die SUMO Lokalisierung der Insektenzelllinie TN-368 zu beeinflussen und SUMO in PML Domänen zu rekrutieren. Im Infektionsverlauf kolo-kalisierten PML und SUMO gleichermaßen und zeigten eine deckungsgleiche Anordnung sowohl in der frühen als auch in der späten Phase der Infektion. Der Modifizierungsmechanismus der SUMO Konjugation scheint daher in TN-368 Zellen konserviert zu sein.

13.2 Potentielle kovalente Modifizierung von PML im Infektionsverlauf

Transfektions- und Infektionsstudien zeigten die Interaktion von PML und SUMO durch die Rekrutierung von SUMO in nukleäre PML Domänen der Insektenzellen. Im Säugersystem konnte die direkte Konjugation von PML Fraktionen durch SUMO-1 nachgewiesen werden. Der SUMOylierungsgrad dieser PML Fraktionen war durch Streß oder virale Infektion zu beeinflussen (Müller et al., 1998; Everett et al., 1998a). Ob bestimmte PML Fraktionen auch während der Baculovirusinfektion modifiziert vorlagen, sollte durch Westernblot Technik überprüft werden.

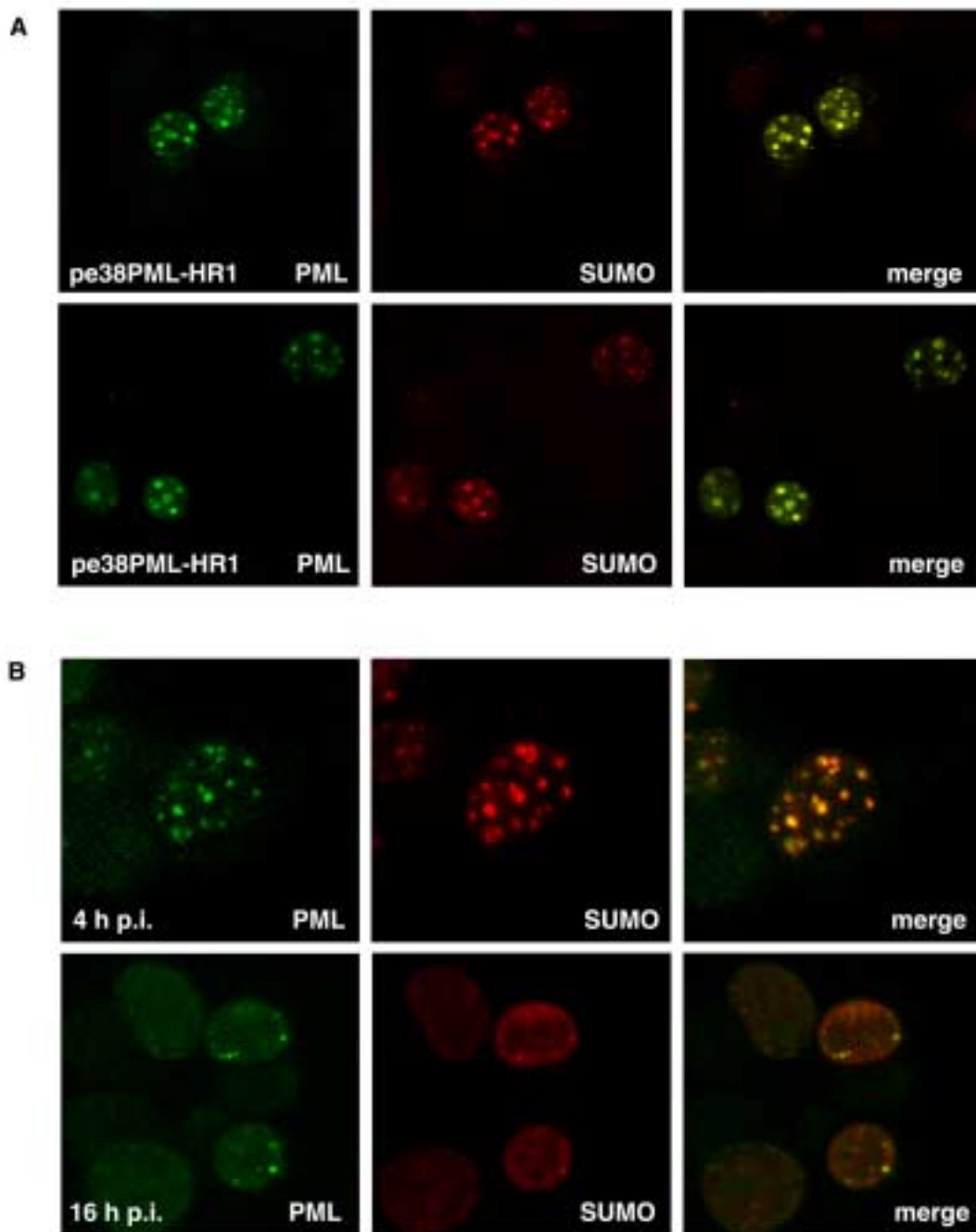


Abb. 27: Kolokalisierung von PML und SUMO nach Transfektion der Zelllinie TN-368 und im Infektionsverlauf

TN-368 Zellen wurden mit dem Plasmid pe38PML-HR1 transfiziert und 48 Stunden nach der Transfektion in 2% Paraformaldehyd fixiert. Außerdem wurden TN-368 Zellen mit dem rekombinanten Virus AcMNPV-PML/e infiziert und infizierte Zellen wurden 4 und 16 h.p.i. in 2% Paraformaldehyd fixiert. Zum Nachweis von SUMO und PML wurden die Zellen mit polyklonalem anti-dSmt3 Kaninchenserum und mit mAB5E10 inkubiert. SUMO wurde mit Cy3-gekoppelten Antikörpern (rot) und PML mit FITC-gekoppelten Antikörpern (grün) sichtbar gemacht. Die Überlagerungen der Signale einer Zelle sind rechts dargestellt. Dabei zeigen gelbe Signale Kolokalisierung an. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskopsystems der Firma Leica angefertigt.

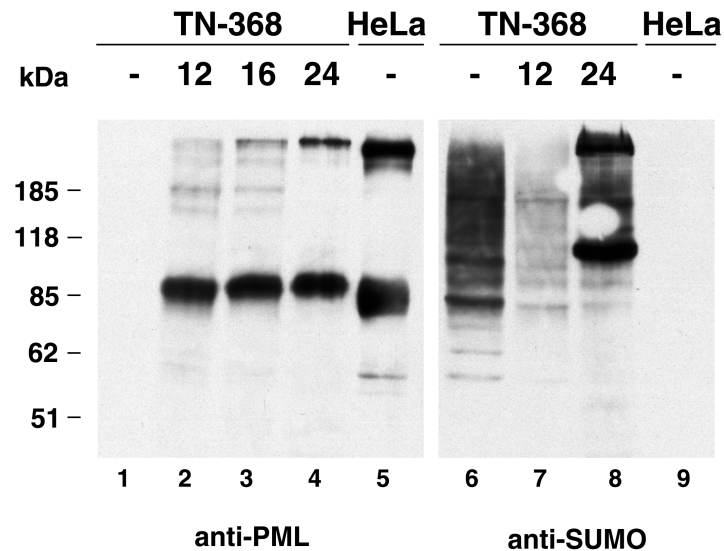


Abb. 28: Potentielle kovalente Modifizierung von PML im Infektionsverlauf.

TN-368 Zellen wurden mit dem rekombinanten Virus *AcMNPV-PML/e* infiziert und Detergenz-Kernextrakte aus uninfizierten (-) und infizierten Zellen 12, 16 und 24 h p.i. präpariert. Außerdem wurden nukleäre Detergenz-Extrakte aus transfizierten HeLa Zellen 48 Stunden nach der Transfektion präpariert. 5×10^6 HeLa Zellen wurden mit $35 \mu\text{g}$ des Plasmids pSG5-PML, das PML unter Kontrolle des SV40 Promotors exprimiert, transfiziert. Die Proteine wurden auf einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und PML wurde mit mAB5E10 (Spur 1-5) und SUMO mit polyklonalem anti-dSmt3 Kaninchenserum (Spur 6-9) nachgewiesen. Die Proteinstandards sind links aufgeführt.

Dazu wurden nukleäre Fraktionen uninfizierter Zellen und AcMNPV-PML/e infizierter Zellen 12, 16 und 24 h p.i. analysiert. Nach der Inkubation mit PML spezifischen Antikörpern konnten neben der ~90 kDa PML Bande auch Banden größer als 118 kDa nachgewiesen werden (Abb. 28, Spur 2-4). Zur Kontrolle des 90 kDa PML Signals wurden nukleäre Extrakte PML transfizierter HeLa Zellen aufgetragen (Abb. 28, Spur 5). Die PML Banden transfizierter HeLa und infizierter Zellen korrelierten. Falls eine Modifizierung des PML Proteins durch SUMO vorlag, könnte die Analyse der Extrakte mit dSmt3 Antikörper darüber Aufschluß geben. Uninfizierte Zellen zeigten ein starkes SUMO Muster, das sich von dem 12 h p.i. kaum unterschied (Abb. 28, Spur 6,7). Unterschiede in der Intensität der Banden waren auf unterschiedliche Proteinkonzentrationen der Extrakte zurückzuführen. 24 h p.i. konnte ein stark sumoyliertes Protein im Molekularbereich von 110 kDa nachgewiesen werden (Abb. 28, Spur 8). Wurde eine Antikörperfärbung mit Präimmenserum durchgeführt, konnten wie bei der Inkubation der PML transfizierten HeLa Extrakte mit dSmt3 Antiserum keine spezifischen Banden nachgewiesen werden (Abb. 28, Spur 9). Es korrelierte jedoch keine der PML Banden mit den nachgewiesenen SUMO Banden, so daß eine SUMOylierung von PML während der Baculovirusinfektion fraglich blieb.

Modifizierte PML Signale konnten durch Westernblot Technik spät in der Infektion nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen in Korrelation mit Untersuchungen zur PML Expression im Infektionsverlauf, da sowohl für die Infektion mit AcMNPV-PML/1 als auch für die Infektion mit AcMNPV-PML/e die Existenz höhermolekularer PML Banden, die sich deutlich von der erwarteten PML Bande unterscheiden, beobachtet wurde (Abb. 7, 8). Damit könnten Modifizierungsmechanismen des PML Proteins in Insektenzellen erhalten sein und zusätzlich auf die Konservierung POD ähnlicher Domänen in Insektenzellen hinweisen.

V. Diskussion

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten die Interaktion der baculoviralen Proteine IE2 und PE38 und ihre dynamische Lokalisierung in funktionellen Kerndomänen. Als Kandidaten für funktionelle Domänen des Zellkerns wurden virusinduzierte Replikationszentren und mit PML markierte Kerndomänen im Infektionsverlauf untersucht und in Relation zur IE2 und PE38 Lokalisierung betrachtet.

1. Virusinduzierte Replikationszentren

Virale Replikationszentren sind markante virusinduzierte Kerndomänen, die funktionell die Replikation des viralen Genoms zur Aufgabe haben. Sie können entweder durch den Einbau des Thymidinanalogons BrdU oder durch virale Faktoren wie DBP oder LEF-3, die permanente Komponenten dieser Replikationszentren sind, markiert werden (Okano et al., 1999). In dieser Arbeit konnten virale Replikationszentren ab 4 h p.i. in einzelnen Zellen beobachtet werden. Im Gegensatz zu Zellen in der S-Phase des Zellzyklus, die Hunderte von kleinen Replikationszentren zeigten, wurden in virusgenomreplizierenden Zellen 5-10 distinkte Kerndomänen mit BrdU markiert. Diese nahmen in der späten Phase der Infektion an Größe zu, so daß fast der gesamte Zellkern BrdU Signale zeigte. Während der Infektion des Kernpolyedervirus *Bombyx mori* kolokalisiert das virale Protein DBP über den gesamten Infektionsverlauf mit BrdU Signalen (Okano et al., 1999). Ursprünglich wurde DBP bei der Identifizierung von Faktoren, die an der Replikation dieses Kernpolyedervirus beteiligt sind, als Bindeprotein für Einzelstrang DNA entdeckt (Mikhailov et al., 1998). Das *Autographa californica* Kernpolyedervirus kodiert ein DBP Homolog, das auf Proteinebene eine Homologie von 96% zu *Bombyx mori* DBP aufweist. Durch Sequenzanalysen wurde das bisher uncharakterisierte Gen orf25 von AcMNPV als DBP Homolog identifiziert (Ayres et al., 1994; Gomi et al., 1999). In dieser Arbeit konnte DBP des Kernpolyedervirus AcMNPV ähnlich wie DBP von BmNPV als permanente Komponente viraler Replikationszentren 6 und 10 h p.i. nachgewiesen werden.

Dabei wiesen im Infektionsverlauf DBP, LEF-3 und BrdU markierte Replikationszentren im Verhältnis zu IE2 Kerndomänen ein relativ heterogenes Erscheinungsbild auf. Etwa

4-6 Stunden nach Beginn der Infektion zeigten einzelne Zellen, aber noch nicht alle infizierten Zellen virale Replikation. Zu diesem Zeitpunkt konnten in virusgenom-replizierenden Zellen distinkte Replikationszentren in unterschiedlicher Größe nachgewiesen werden. Diese Heterogenität der Replikationszentren nach der Markierung der Replikation durch DBP, LEF-3 oder BrdU könnte in der Infektion nicht synchronisierter Zellpopulationen begründet sein. Daß wechselseitige Einflüsse zwischen dem Zellzyklus der Wirtszelle und der viralen Infektion bestehen, ist bereits bekannt. Zum Beispiel zeigen TN-368 Zellen der mittleren bis späten S-Phase eine höhere Sensitivität für AcMNPV Infektionen als Zellen der G2-Phase. Dabei beeinflußt die Zellzyklusphase der Wirtszelle die Produktion infektiöser Virionen allerdings nur wenig (Lynn und Hink, 1978). Daneben arretiert die AcMNPV Infektion asynchrone *S. frugiperda* Wirtszellpopulationen zwischen 18 und 24 h p.i. in der G2/M-Phase des Zellzyklus. Die höchste Rate viraler DNA Replikation wird um 12 h p.i. vor der G2/M-Blockade beobachtet, kann aber auch während der G2/M-Phase stattfinden (Braunagel et al., 1998). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß Baculoviren zellzyklusabhängige Strategien der Virusreplikation entwickelt haben. Daher könnte die baculovirale Replikation tatsächlich durch die Zellzyklusphase der Wirtszelle beeinflußt werden und die Heterogenität der Replikationszentren könnte sich darin begründen.

2. IE2 Assoziation mit frühen viralen Replikationszentren

Immunfluoreszenzstudien und Immunpräzipitationen des IE2 Komplexes zeigten 6 h p.i. die Assoziation von IE2 mit viraler Replikation. Diese Assoziation war in der frühen Phase der Virusreplikation am offensichtlichsten, da ab 8 h p.i. die Replikationszentren extrem an Größe zunahmen.

Ein Effekt der IE2 Expression auf die virale Replikation konnte schon in transienten Replikationsstudien von Reporterplasmiden, die eine homologe Region als potentielle Replikationsstartstelle beinhalteten, nachgewiesen werden (Kool et al., 1994; Lu und Miller, 1995). Dabei erhöhte IE2 in Anwesenheit von AcMNPV Genen, die essentiell für die Replikation von Plasmid DNA waren, wie z. B. IE1 oder LEF-3, die Replikation, war aber selbst nicht essentiell. Es wird diskutiert, daß der stimulierende IE2 Effekt auf die Replikation in der regulatorischen Funktion des IE2 Proteins begründet ist. DNA bindende Eigenschaft wurde bisher für IE2 nicht beschrieben (Yoo und Guarino, 1994b), so daß IE2 Effekte auf Transkription oder Replikation wahrscheinlich nicht auf Wechselwirkungen mit DNA

Sequenzen beruhen, sondern über Protein-Protein Wechselwirkungen stattfinden könnten. In dieser Arbeit kopräzipitierte die Immunpräzipitation des IE2 Komplexes 6 h p.i. den viralen Faktor PE38, der ein potentielles DNA bindendes Motiv enthält (Mikhailov et al., 1998; Krappa und Knebel-Mörsdorf, 1991) und in transienten Replikationsstudien wie IE2 stimulierende Wirkung auf die Replikation hat (Kool et al., 1994). Außerdem konnte durch Präzipitation mit immobilisiertem IE2 Antiserum, das kovalent an Sepharose gekoppelt war, im Gegensatz zur Präzipitation mit Sepharose, das virale Protein DBP zusammen mit IE2 6 h p.i. präzipitiert werden. Dieses Vorkommen von IE2, PE38 und DBP in gemeinsamen Komplexen 6 h p.i. und die Kolokalisierung von IE2 mit BrdU oder LEF-3 6 h p.i. zeigte die Assoziation von IE2 über potentielle Protein-Protein Wechselwirkungen mit stimulierenden und essentiellen Faktoren der Replikation und könnte ihm eine Funktion zu Beginn der viralen Replikation zuweisen.

DBP und LEF-3 binden beide bevorzugt an Einzelstrang DNA und wurden daher als Einzelstrangbindeproteine (SSB) bezeichnet (Mikhailov et al., 1998; Hang et al. 1995). Während der baculoviralen Replikation könnten diese Einzelstrangbindeproteine für die Initiation und Elongation der Replikation benötigt werden. Bei der Initiation diverser Replikationssysteme helfen SSB Proteine bei der lokalen Entwindung der DNA an Replikationsstartpunkten. Später während der Elongation stabilisieren sie die parenteralen Einzelstrangarme der DNA Replikationsgabel und unterstützen damit die Aktionen anderer Replikationsfaktoren. In den Kolokalisierungsstudien dieser Arbeit assoziierte IE2 nur bis 6 h p.i. offensichtlich mit DBP/LEF-3 bzw. mit BrdU markierten viralen Replikationszentren, und ab 8 h p.i. wurde diese Assoziation nicht mehr deutlich beobachtet. Dagegen kolokalisierten DBP und BrdU Signale bis 10 h p.i. IE2 könnte daher eine Helferfunktion bei der Initiation der viralen Replikation haben, die während der Elongationsphase in den Hintergrund tritt. Diese Theorie würde im Einklang mit der stimulierenden Wirkung von IE2 in Plasmidreplikationsassays stehen, da IE2 selbst nicht an der Plasmidreplikation beteiligt ist.

Möglicherweise spielt der RING-Finger des IE2 Proteins für die IE2 Effekte auf die Replikation eine Rolle. Denn rekombinante Viren, die eine Deletion in der RING-Finger Region des IE2 Proteins tragen, zeigen in Zellkulturen der Spezies *T. ni* eine leicht verspätete DNA Replikation und in Zellen der Spezies *S. frugiperda* deutlich verspätete Replikation (Prihod'ko et al., 1999). Diese Beobachtung könnte in Korrelation mit der potentiellen Helferfunktion von IE2 bei der Initiation der viralen Infektion stehen, müßte aber durch weitere Untersuchungen gestützt werden.

3. PML, Marker potentieller insektenzellspezifischer PODs

Als Kandidat für potentielle zelluläre Kerndomänen wurde die Lokalisierung des Proteins PML, einer Komponente der PODs aus Säugerzellen, untersucht. Um mutmaßliche PODs der Insektenzellen zu kennzeichnen, wurde eine Variante des humanen PML Proteins als Marker für insektenspezifische PODs entweder transfiziert oder mit Hilfe von Virusrekombinanten exprimiert.

3.1 Verspätete PML Expression im Infektionsverlauf

Zur effizienten und zeitlich koordinierten Expression des humanen PML Proteins in infizierten Insektenzellen, wurden rekombinante Viren hergestellt. Diese exprimierten PML unter der Kontrolle des frühen pe38 Promotors. Anders als erwartet exprimierten die rekombinanten Viren AcMNPV-PML/1 und AcMNPV-PML/e heterologes PML im Vergleich zu endogenem PE38 verspätet. Beide Viren zeigten starke PE38 Expression zwischen 2 und 12 h p.i. Dagegen exprimierte AcMNPV-PML/1 PML nachweisbar ca. 6 Stunden später als PE38, während AcMNPV-PML/e PML ca. 2 Stunden später exprimierte. Durch homologe Rekombination wurde auf beiden Virusgenomen eine pe38/PML Kasette in die polyhedrin Genregion inseriert. Der polyhedrin Promotor wird in der sehr späten Phase der Infektion hyperexprimiert und ist ab ca. 18 h p.i. stark transkriptionell aktiv (Friesen und Miller, 1986). Möglicherweise beeinflusste diese späte Expression der polyhedrin Genregion die transkriptionelle Aktivität der heterologen pe38 Promotoren der beiden PML Virusrekombinanten und bedingte dadurch die verspätete PML Expression.

Das rekombinante Virus AcMNPV/PE38 trägt gleichartig der pe38/PML Insertion der PML Virusrekombinanten eine pe38/LacZ Kasette in der polyhedrin Genregion (Knebel-Mörsdorf et al., 1996). Die Analyse der transkriptionellen Aktivität dieser pe38/lacZ Kasette zeigt in der frühen Phase der Infektion weniger pe38/lacZ Transkripte im Vergleich zu wt pe38 Transkripten. Außerdem steigt die Menge heterologer lacZ Transkripte 12-24 h p.i. an. Die Analyse des Transkriptionsstarts der pe38/lacZ Transkripte zeigt, daß die heterologe Transkription authentisch zur wt pe38 Transkription initiiert und kein alternativer Transkriptionsstart für die verspätete Transkription der pe38/LacZ Transkripte verantwortlich ist (Knebel-Mörsdorf et al., 1996). Da die PML Expression der PML Rekombinanten mit der LacZ Expression von AcMNPV/PE38 korrelierte, könnte die zeitlich verschobene Expression von PML entsprechend der LacZ Rekombinanten tatsächlich auf einer veränderten Regulation

der heterologen pe38 Promotoren unter Einfluß der polyhedrin Genregion beruhen.

Daß andere Mechanismen die Unterschiede in der PE38/PML Expression beeinflussen, wie z. B. eine veränderte Stabilität der PML Transkripte gegenüber PE38 Transkripten oder die Konkurrenz des endogenen und heterologen pe38 Promotors um Transkriptionsfaktoren, kann nicht ausgeschlossen werden. Zusätzlich könnte eine ineffiziente Termination der PML Expression durch das SV40 Polyadenylierungssignal im Vergleich zur pe38 Termination auftreten. Studien an rekombinanten Baculoviren, die ein Reporter-gen unter Kontrolle des p10 Promotors exprimieren, zeigen in diesem Zusammenhang nach dem Austausch der p10 3'-untranslatierten Region gegen eine SV40 Terminationssequenz reduzierte Fremdgen-expression im Infektionsverlauf (van Oers et al., 1999).

Trotz der verspäteten Expression des rekombinanten PML Proteins durch die PML Virusrekombinanten, konnte die Rekombinante AcMNPV-PML/e, die PML 2 Stunden später als PE38 exprimierte, zur Markierung potentieller PODs der Insektenzelle im Infektionsverlauf verwendet werden. Sie garantierte effiziente PML Expression sowohl in der frühen als auch in der späten Phase des Infektionszyklus und erlaubte damit Kollokalisierungsstudien mit den baculoviralen Faktoren IE2 und PE38.

3.2 Interaktion von PML mit SUMOylierungsmechanismen der Insektenzelle

Um das Vorkommen POD homologer Strukturen in Insektenzellen zu überprüfen, wurde neben der Lokalisierung von PML die Assoziation PML markierter Domänen mit konservierten POD interagierenden Faktoren der Insektenzelle untersucht.

PML lokalisierte sowohl in infizierten als auch in transfizierten Insektenzellen ähnlich wie in Vertebratenzellen in nukleären Domänen, die sich homogen auf diffusem Grund im gesamten Kern verteilten. In Säugerzellen hängt die PML Lokalisierung von posttranslationalen Modifikationen wie der kovalenten Bindung an SUMO-1 ab. Es wird angenommen, daß nur SUMO modifiziertes PML mit PODs assoziiert vorliegt, während ungekoppeltes PML in diffuser Verteilung im Zellkern lokalisiert (Duprez et al., 1999; Müller et al., 1998). Das endogene SUMO der Insektenzelllinie TN-368 konnte mit Hilfe eines Antiserums, das das SUMO-1 Homolog dSmt3 aus *Drosophila* erkannte, nachgewiesen werden. Dabei lokalisierte endogenes SUMO hauptsächlich diffus im Zellkern. Einige Zellen zeigten zusätzlich kleine Domänen am Rand des Zellkern, die mit der beschriebenen Assoziation des SUMO Proteins mit Kernporenkomplexen korrelieren könnte (Saitoh et al., 1997). In *Drosophila* SL2 Zellen

und in HeLa Zellen wurden ähnliche endogene SUMO Muster wie in TN-368 Zellen beobachtet (Lehembre et al., 2000; Müller et al., 1998). Damit könnte SUMO wie Ubiquitin, zu dem es Homologie aufweist, in Invertebratenzellen und Vertebratenzellen funktionell konserviert sein.

Als erstes invertibratenspezifisches Protein, das durch endogenes SUMO kovalent modifiziert wird, wurde der transkriptionelle Repressor Tramtrack aus *Drosophila* identifiziert (Lehembre et al., 2000). Neben Tramtrack kann auch transfiziertes humanes PML als Substrat für den SUMOylierungsmechanismus in *Drosophila* SL2 Zellen agieren (Lehembre et al., 2000). In dieser Arbeit führte die Expression von PML in TN-368 Zellen sowohl in uninfizierten als auch in infizierten Zellen zur Rekrutierung von endogenem SUMO in PML markierte Domänen und weist auf konservierte Interaktionswege PML markierter Domänen mit SUMOylierungsmechanismen in TN-368 Zellen hin. Ob PML auch in der Zelllinie TN-368 kovalent mit SUMO konjugiert vorliegt, ist noch unklar. Allgemein konnten jedoch Modifikationen des PML Proteins im Infektionsverlauf nachgewiesen werden. Ab 12 h p.i. wurden PML Banden mit höherem Molekulargewicht als 90 kDa nachgewiesen. Dieses Ergebnis führte zu der Hypothese, daß es sich dabei um SUMO modifizierte PML Varianten handelt. Keine der hochmolekularen Banden korrelierte jedoch mit SUMO Banden der gleichen Extrakte. Zur endgültigen Prüfung einer möglichen SUMO Konjugation des PML Proteins in TN-368 Zellen müßten Immunpräzipitationsexperimente mit SUMO oder PML spezifischen Antikörpern durchgeführt werden.

Studien mit Herpesviren zeigten, daß nicht nur zelluläre Proteine wie PML oder SP100 Substrate für SUMO Modifikationen sind, sondern auch die HCMV kodierten Proteine IE1 und IE2 SUMO konjugiert werden (Müller und Dejean, 1999; Hofmann et al., 2000). SUMO Konjugation findet sequenzspezifisch an einem Lysin-Rest dieser viralen Proteine statt und scheint für alle SUMO Substrate konserviert zu sein. Nach Transfektion kolokalisieren die HCMV Proteine IE1 und IE2 mit PODs (Ishov et al., 1997). Möglicherweise könnten die baculoviralen Proteine IE2 und PE38, die nach Transfektion auch in Assoziation mit PML/SUMO Domänen beobachtet werden, analog zu IE1/IE2 aus HCMV SUMOyliert werden. Die transiente Expression von IE2 und PE38 in Insektenzellen hatte allerdings im Gegensatz zur PML Expression keinen Einfluß auf die endogene SUMO Lokalisierung. Damit scheint eine SUMOylierung von IE2 und PE38 in Insektenzellen eher unwahrscheinlich, schließt sie aber nicht vollkommen aus. In diesem Zusammenhang wies die Analyse von Kernextrakten 24 h p.i. im Vergleich zu uninfizierten Zellen ein stark SUMOyliertes Protein im Molekularbereich von ca. 110 kDa nach. Es gibt Hinweise, daß der

größte Teil der Wirtsproteinsynthese 24 h p.i. abgeschaltet ist (Carstens et al., 1979; Wood 1980). Deshalb könnte das SUMO konjugierte 110 kDa große Protein möglicherweise baculoviral kodiert sein und einen Hinweis auf die potentielle SUMOylierung baculoviraler Proteine im Infektionsverlauf liefern. Allerdings kann auch die SUMO Konjugation eines Wirtsproteins zu diesem Zeitpunkt der Infektion nicht ausgeschlossen werden.

Die Konservierung des SUMO Modifizierungspfades in TN-368 und die Rekrutierung von SUMO in PML markierte Domänen durch die Expression von PML weisen auf eine Konservierung POD homologer Domänen in TN-368 Zellen hin.

4. IE2 und PML Umstrukturierung während der Baculovirusinfektion

Zur Analyse der Effekte der Baculovirusinfektion auf potentielle PODs der Insektenzelle und zur Funktionsanalyse der IE2 und PE38 Kerndomänen wurde die Assoziation von IE2 und PE38 mit PML markierten Domänen im Infektionsverlauf und in Transfektionsstudien untersucht.

In der frühen Phase der Infektion kolokalisierte PML mit IE2 in gemeinsamen Domänen und zeigte auch nach Transfektion in Abwesenheit anderer viraler Faktoren, die Assoziation mit IE2 in Insekten- und Säugerzellen. Die Kolokalisierungsexperimente zeigten die Assoziation von IE2 und PML 4 und 8 h p.i. Ab 12 h p.i. reduzierte sich die Anzahl an IE2 bzw. PML Domänen stark, so daß die Anzahl an Domänen, die beide Proteine beinhalteten, abnahm. PML, das zuvor in nukleären Domänen im gesamten Kern beobachtet werden konnte, zeigte zu diesem Zeitpunkt ein diffuses Muster mit kleinen Domänen in der Nähe des Kernrandes, während IE2 fadenförmige Strukturen ausbildete. Im Gegensatz zur Infektion wurden umstrukturierte PML Domänen nach der transienten Expression von PML nicht beobachtet. Damit könnte die Organisation der PML Lokalisierung im Infektionsverlauf auf der Interaktion von PML mit viralen und/oder zellulären Faktoren, die infektionsspezifisch auftreten, beruhen.

Die Umorganisation bzw. die Auflösung von PML Komplexen durch virale Faktoren säugerspezifischer DNA Viren ist bereits bekannt. Virale Proteine, wie das HSV-1 kodierte ICPO, die HCMV kodierten Proteine IE1 und IE2 oder das adenovirale Protein E4Orf3, beginnen ihre Interaktion mit PODs mit einer PML Kolokalisierung zu einem frühen

Zeitpunkt der Infektion. Diese Interaktion endet über verschiedene Mechanismen in der Umstrukturierung von PML, die ebenfalls in der frühen Phase der Infektion stattfindet (Maul, 1996). Baculovirusinfizierte Zellen zeigen diesen Proteinen ähnlich die Kolokalisierung von IE2 und PML vor der Umstrukturierung PML markierter Kerndomänen. Die Ad5 Infektion führt innerhalb der ersten 4 Stunden der Infektion zur Umstrukturierung von PODs in filamentöse Strukturen, die PML und das für die Umstrukturierung verantwortliche Protein E4Orf3 beinhalten (Carvalho, et al. 1995; Doucas et al., 1996; Leppard und Everett, 1999). Die Umstrukturierung des baculoviralen IE2 Proteins ab 12 h p.i. in fadenförmige Strukturen erinnert leicht an die adenovirale Umstrukturierung von PML in Filamente. Trotz dieser Korrelationen scheint sich der Mechanismus der PML Umstrukturierung während der Baculovirusinfektion von den Mechanismen säugerspezifischer Viren zu unterscheiden. Der offensichtlichste Unterschied ist der Zeitpunkt der PML Umstrukturierung, der in Insektenzellen erst in der späten Phase der Infektion stattfindet. Bisher wurde keine Virusfamilie identifiziert, die PML Domänen ähnlich wie Baculoviren in der späten Phase der Infektion umstrukturiert. Ein weiterer Unterschied zwischen IE2 und den viralen Proteinen ICP0, IE1 und E4Orf3 besteht darin, daß diese in transienten Expressionsstudien das Potential besitzen, PML Domänen umzustrukturieren, IE2 dieses Potential aber nicht besitzt (Maul et al., 1993; Everett und Maul, 1994; Ahn und Hayward, 1997; Koriotoh et al., 1996; Carvalho, et al. 1995). Die Koexpression von IE2 und PML in Insektenzellen zeigte zwar die Kolokalisierung von IE2 und PML, aber keine offensichtliche PML Umstrukturierung. Diese Eigenschaft teilt IE2 mit dem HCMV Protein IE2, das auch nach transienter Expression mit PODs kolokalisiert, diese aber nicht umstrukturiert (Ahn und Hayward, 1997).

Die PML Umstrukturierung im baculoviralen Infektionsverlauf hängt also nicht alleine von IE2 ab, sondern benötigt Faktoren, die während der Infektion zusätzlich auftreten. Die Analyse der IE2/PML Domäne durch Immunpräzipitation könnte diese Faktoren identifizieren. Die Immunpräzipitation der IE2/PML Domäne gestaltet sich allerdings als komplex und könnte in Korrelation mit ihren dynamischen Eigenschaften stehen. Der Versuch der Kopräzipitation von PML und IE2 durch immobilisiertes IE2 Antiserum führte weder in der frühen noch in der späten Phase der Infektion zum Erfolg. Da SUMO Konjugationswege in Insektenzellen konserviert sind (Lehembre et al., 2000), könnte PML auch in der Zelllinie TN-368 SUMOyliert werden. Der Verlust dieser Modifikation während der Extraktpräparation könnte zur Trennung von PML und IE2 führen, da nur SUMO konjugiertes PML in nukleären Domänen lokalisiert. Andererseits ist PML ein kernmatrixassoziiertes Protein (Stuurman et al., 1992) und könnte durch das Fehlen von

Detergenz im Extraktionspuffer ineffizient in Lösung gebracht werden und damit nicht in ausreichender Menge für die Kopräzipitation zur Verfügung stehen.

IE2 war nicht das einzige baculovirale Protein, das mit PML assoziierte. Auch PE38 konnte wiederholt in Assoziation mit transient exprimiertem PML in Insektenzellen oder mit endogenem PML aus Säugerzellen beobachtet werden. Die Untersuchung der PE38/PML Wechselwirkung im Infektionsverlauf war nicht möglich, da PE38 zu keinem Zeitpunkt der Infektion gemeinsam mit PML in nukleären Domänen vorlag. Eine Gemeinsamkeit von PML und PE38 ist durch ihre Kopplung an Apoptosemechanismen gegeben. PE38 erhöht in transienten Expressionsstudien Apoptose, die durch das virale IE1 Protein induziert wird (Prikhod'ko und Miller, 1999), während PML neben eigener pro-apoptotischer Aktivität mit dem pro-apoptotischen Faktor Daxx kolokalisiert und interagiert (Zhong et al., 2000). Ob diese Parallele bei der Kolokalisierung von PE38 und PML eine Rolle spielt, müssen weitere Studien zeigen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß ähnlich wie säugerspezifische DNA Viren auch das Baculovirus AcMNPV frühe Proteine kodiert, die mit PML markierten Kerndomänen assoziieren oder vermutlich sogar interagieren. Die Assoziation von baculoviralem IE2 bzw. PE38 und PML könnte auf konservierte Wechselwirkungen zwischen viralen Proteinen und nukleären Strukturen in Insektenzellen hinweisen und damit das Baculovirus als System zur Untersuchung POD homologer Strukturen der Insektenzelle anbieten.

5. IE2 und PE38: Partner während der Baculovirusinfektion

Neben der Lokalisierung von IE2 und PE38 in funktionellen Kerndomänen wurde auch die potentielle Assoziation von IE2 und PE38 in gemeinsamen Kerndomänen im Infektionsverlauf untersucht. Indirekte Immunfluoreszenzstudien zeigten die Kolokalisierung von IE2 und PE38 in gemeinsamen Domänen 2 h p.i., die ab 4 h p.i. aufgrund der Lokalisierung von PE38 in granulären Kernstrukturen nicht mehr nachzuweisen war. Demgegenüber kopräzipitierten spezifische Antiseren gegen IE2 oder PE38 beide Proteine zwischen 2 und 12 h p.i. in gemeinsamen Komplexen. Immunfluoreszenzstudien transfizierter Insekten- oder Säugerzellen zeigten die Assoziation von IE2 und PE38 auch in Abwesenheit viraler Infektion. Möglicherweise nahmen virale oder zelluläre Faktoren, die später als 2 h p.i.

exprimiert wurden, Einfluß auf die PE38 Lokalisierung, konnten aber die IE2/PE38 Wechselwirkung nicht beeinflussen. PE38 könnte demnach eine mobile Komponente der IE2 Domäne darstellen, die möglicherweise zwischen einzelnen Kernbereichen hin und her pendelt. Informationen zur IE2/PE38 Lokalisierung bzw. Wechselwirkung gaben Transfektionsstudien von Insekten- und Säugerzellen.

Der Vergleich der PE38 und IE2 Lokalisierungsmuster von infizierten und transfizierten Zellen zeigte die Formation unterschiedlicher Kernstrukturen: nukleäre Domänen und nukleäre Foci. In transfizierten Insektenzellen zeigte IE2 eine Lokalisierung in nukleären Domänen, die denen der Infektion sehr ähnlich waren. Trotzdem konnte transient exprimiertes IE2 selten in nukleären Foci beobachtet werden. Da IE2 während der Infektion nie in nukleären Foci lokalisierte, wurde das Auftreten dieser Struktur in transfizierten Insektenzellen auf eine mögliche Überexpression von IE2 zurückgeführt. Nach Transfektion von Säugerzellen lokalisierte IE2 nur selten in nukleären Domänen. Angenommen, die IE2 Lokalisierung in nukleären Domänen beruhte auf einer Assoziation mit bestimmten nukleären Domänen bzw. definierten zellulären Faktoren, war diese im heterologen System weniger stark ausgeprägt. Wurde PE38 mit IE2 kotransfiziert, konnte die Anzahl an BHK21 Zellen mit IE2 in nukleären Domänen/Foci signifikant erhöht werden. Da beide Proteine unter Kontrolle des CMV Promotors exprimiert wurden, konnte ein regulatorischer Effekt von PE38 auf die IE2 Expression ausgeschlossen werden. Demnach schien PE38 direkt Einfluß auf die IE2 Lokalisierung in Säugerzellen auszuüben und IE2 in nukleäre Domänen zu rekrutieren.

PE38 lokalisierte im Gegensatz zu IE2 im Infektionsverlauf nur 2 h p.i. in einigen nukleären Domänen. In Abwesenheit viraler Infektion lokalisierte PE38 sowohl in Insekten- als auch in Säugerzellen in nukleären Foci, egal ob mit oder ohne IE2. Diese Diskrepanz in der Lokalisierung von PE38 in infizierten und transfizierten Zellen führte zu der Suche nach viralen oder zellulären Faktoren, die die Lokalisierung von PE38 bedingten (Quadt, 2000). Diese Faktoren müßten infektionsspezifisch auftreten und in Transfektionsexperimenten fehlen. Erste Ergebnisse zeigten, daß durch die ausschließliche Expression des *pe38* Gens, eine ähnliche PE38 Lokalisierung in transfizierten Zellen wie in infizierten Zellen erzielt werden kann. Dabei spielen Sequenzen, die sich stromabwärts des *pe38* Gens befinden, für die PE38 Lokalisierung eine Rolle. Das uncharakterisierte *AcMNPV* Gen *orf154* wurde als Kandidat identifiziert, der die PE38 Lokalisierung beeinflusst. Dieser Einfluß stellte sich als komplex dar, da das ORF154 möglicherweise in transfizierten Zellen die Lokalisierung von PE38 anders beeinflusst als im Infektionsverlauf (Quadt, 2000). Ob das *orf154* im Infektionsverlauf exprimiert wird und wie sich sein Einfluß auf die PE38 Lokalisierung

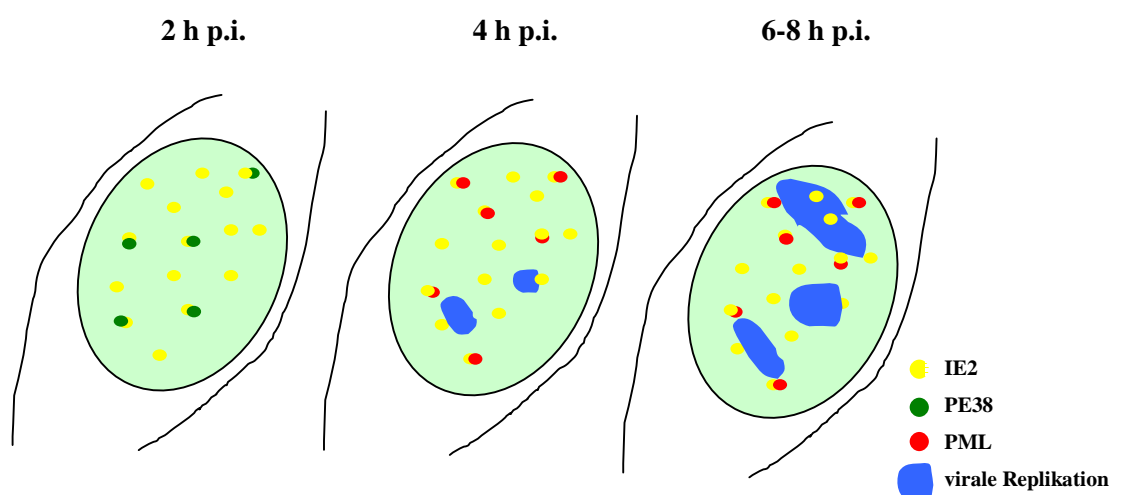
auswirkt, wird in weiteren Studien untersucht. Einen geringfügigen Einfluß auf die PE38 Lokalisierung schien in dieser Arbeit auch die Koexpression von IE2 zu haben, da nach der Koexpression beider Proteine in Insektenzellen eine Assoziation von IE2 und PE38 zwar auch in nukleären Foci beobachtet werden konnte, diese aber in nukleären Domänen deutlicher zu beobachten war. Dieser zusätzliche Einfluß des IE2 Proteins auf die PE38 Lokalisierung würde die Wechselwirkung beider Proteine bestärken.

Da IE2 und PE38 in Abwesenheit anderer viraler Faktoren kolokalisierten und PE38 bzw. IE2 Einfluß auf die gegenseitige Lokalisierung nahmen, könnte sich ihre Kolokalisierung 2 h p.i. wie folgt erklären. Entweder förderte PE38 die Assoziation von IE2 mit bestimmten nukleären Domänen, mit denen IE2 alleine (wie in transfizierten BHK21 Zellen) nur schwer in Assoziation treten könnte, und verläßt danach die gemeinsamen Domänen. Oder IE2 unterstützte die PE38 Lokalisierung in gemeinsamen Domänen, die in Anwesenheit bestimmter Faktoren der Infektion aufgelöst wurden. Eine Analyse der IE2/PE38 Kolokalisierung früher als 2 h p.i. war aus quantitativen Gründen mit immunfluoreszenztechnischen Mitteln nicht möglich. Ob PE38 die Lokalisierung von IE2 oder IE2 die Lokalisierung von PE38 im Infektionsverlauf förderte, könnten Untersuchungen an rekombinanten Proteinen, die veränderte Lokalisierungen im Vergleich zu wt Proteinen aufweisen, zeigen. Ein Beispiel für eine PE38 Mutante mit veränderter Lokalisierung zeigte die Deletion von 38 Aminosäuren am N-Terminus des Proteins. In Transfektionsstudien resultierte die Expression dieses verkürzten Proteins in der zytoplasmatischen Lokalisierung von PE38 (Prihod'ko und Miller, 1999). Im Vergleich dazu war die Deletion von 14 Aminosäuren am C-Terminus von IE2 ausreichend, um IE2 nicht ausschließlich im Zellkern, sondern auch im Zytoplasma zu exprimieren (Yoo und Guarino, 1994a). Eine Mutante, die IE2 nur im Zytoplasma der infizierten Zelle exprimiert, wurde bisher nicht beschrieben.

6. Potentielle Organisation der IE2 Domänen in der frühen Phase der Infektion

Das baculovirale Protein IE2 lokalisierte im Infektionsverlauf in dynamischen Kernstrukturen, die mit verschiedenen Partnern, viraler oder zellulärer Natur assoziierten. Dabei wurde die Assoziation von IE2 mit viralen Replikationszentren, mit der potentiellen zellulären Komponente PML und mit dem viralen Faktor PE38 offensichtlich. Die Assoziation der IE2 Domänen mit verschiedenen Partnern steht im Einklang mit den multiplen Funktionen des IE2 Proteins auf viraler und zellulärer Ebene. Die Organisation der

IE2 Domänen im Kern der infizierten Zelle könnte dabei für die jeweilige IE2 Funktion eine Rolle spielen. Um eine Aussage über die Organisation der IE2 Domänen im Bezug auf ihre Assoziationspartner und damit verbundene Funktionen der IE2 Domänen treffen zu können, ist in der Abbildung 29 die Lokalisierung von IE2/PML und IE2/BrdU zum Zeitpunkt 6 h p.i. vergleichend abgebildet. Zu diesem Zeitpunkt der Infektion kolokalisieren IE2 Domänen sowohl mit PML als auch mit viraler Replikation. Über die Verbindung zu IE2 könnte PML theoretisch auch in Assoziation mit viraler Replikation erwartet werden. Entgegen dieser Erwartung kolokalisiert PML 6 h p.i. nur selten mit BrdU markierten Replikationszentren und wird dagegen in direkter Nachbarschaft der viralen Replikation beobachtet (Abb. 29). Diese Diskrepanz führte zu der Hypothese, daß funktionell unterschiedliche IE2 Domänen im Infektionsverlauf auftreten und PML bzw. BrdU jeweils eine Subpopulation der IE2 Domänen markieren. In Korrelation mit dieser Hypothese steht die Beobachtung, daß die Kolokalisierungsexperimente nie die Assoziation aller IE2 Domänen mit BrdU oder PML zeigten, sondern immer IE2 Domänen ohne Partner beobachtet wurden. Partnerfreie IE2 Domänen könnten dabei jeweils der anderen Subpopulation angehören. Ähnliche Verhältnisse von partnerfreien zu partnerassoziierten IE2 Domänen zeigte 2 h p.i. die Kolokalisierung von IE2 und PE38. Aufgrund dieser Beobachtungen könnten sich IE2 Domänen in der frühen Phase der Infektion in Relation zu viral induzierten und potentiellen zellulären Kernstrukturen wie folgt organisieren:



Skizze zur Organisation von IE2, PE38 und PML Domänen sowie zur Organisation viraler Replikationszentren während der frühen Phase der Virusreplikation.

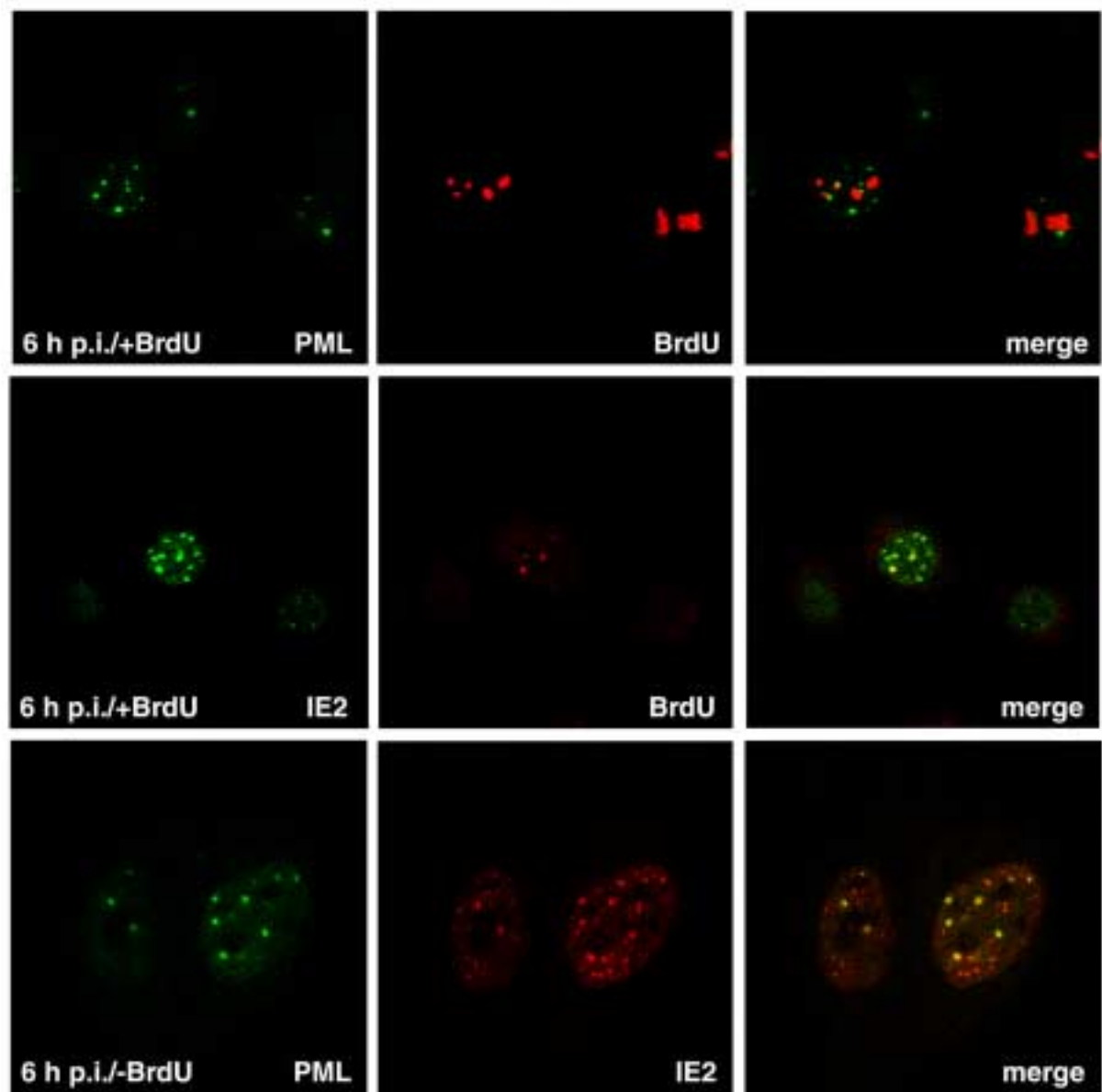


Abb. 29: Lokalisierung von PML/BrdU, IE2/BrdU und PML/IE2 6 h p.i.

Ab 2 h p.i. formieren sich im Zellkern der infizierten Zellen nachweisbar IE2 Domänen, von denen ein Teil mit PE38 assoziiert. PE38 wird aus diesen Domänen entlassen und ab 4 h p.i. nicht mehr in nukleären Domänen beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt kolokalisiert IE2 mit PML in gemeinsamen Domänen. Ob dabei die vorherige Assoziation mit PE38 eine Rolle spielt, ist unbekannt. Zur gleichen Zeit initiiert an anderen IE2 Domänen erstmals die virale Replikation, die 6 h p.i. vermehrt stattfindet. Die Bereiche viraler Replikation nehmen 6-8 h p.i. an Größe zu, so daß das PML Protein der IE2/PML Domäne zu diesem Zeitpunkt in Zellen mit großen Replikationszentren in direkter Nähe viraler Replikation beobachtet werden kann. IE2 lokalisiert nach der Initiation der viralen Replikation sowohl in als auch außerhalb der Replikationsorte. Während der gesamten Phase der viralen Replikation steht IE2 mit PE38 in Kontakt.

Diese Hypothese weist einem Teil der IE2 Domänen eine Funktion bei der Initiation der viralen Replikation zu, während eine andere Subpopulation der IE2 Domänen mit potentiellen PODs der Insektenzellen assoziiert, die möglicherweise, wie für Säugerzellen postuliert, eine Funktion in der viralen Abwehr haben könnten. Die Funktion der Assoziation von IE2 und PE38 in gemeinsamen Domänen wird noch diskutiert. Sie könnte aber beispielsweise mit ihrer gemeinsamen Eigenschaft, frühe virale Genexpression zu regulieren, zusammenhängen.

Da PML auch selten in direkter Assoziation mit BrdU markierten Replikationszentren beobachtet wurde, kann eine Kolokalisierung von IE2, PML und BrdU in gemeinsamen Domänen nicht ausgeschlossen werden. Eine abschließende Klärung dieser Frage könnte durch die Tripelfärbung *AcMNPV*-PML/e infizierter, BrdU markierter Zellen mit IE2, PML und BrdU spezifischen Antikörpern erzielt werden.

7. Ausblick

7.1 Identifizierung POD homologer Strukturen der Insektenzelle

Diese Arbeit beschreibt die Existenz potentieller POD homologer Strukturen in Invertebratenzellen. Heterolog exprimiertes PML aus Säugerzellen assoziierte mit nukleären Domänen der Insektenzelle und erkannte dabei mögliche POD homologe Strukturen der Invertebraten. Als Faktoren, die mit PML in diesen Domänen im Infektionsverlauf

kolokalisieren, wurden das virale Protein IE2 und die zelluläre Komponente SUMO identifiziert. Zur Charakterisierung weiterer Komponenten dieser Kernstrukturen könnte ein Homologievergleich aller bisher identifizierten POD Komponenten mit insektenspezifischen Gendatenbanken hilfreich sein. Eine weitere Möglichkeit, potentielle PODs der Insekten zu charakterisieren, ist die Identifizierung von PML, IE2 und SUMO Assoziationspartnern. Dabei könnte die Expression von GST-Fusionsproteinen durch stabil transfizierte Zelllinien genutzt werden. Im Säugersystem wurden mehrere POD Komponenten neben Lokalisierungsstudien und Immunpräzipitationen mit Hilfe des Hefe 2-Hybrid Systems identifiziert. Durch Immunpräzipitationen der PML/IE2 bzw. PML/SUMO Komplexe oder durch die Untersuchung der Proteine PML, IE2 und SUMO mit Hilfe des Hefe 2-Hybrid Systems könnten analog potentielle Faktoren insektenspezifischer PODs nachgewiesen werden. Eine weitere Möglichkeit stellt die biochemische Aufreinigung der insektenspezifischen POD Kerndomänen dar. Diese Aufreinigung könnte sich allerdings als schwierig erweisen, da PODs an die Kernmatrix gebunden sind und eine hohe Dynamik aufweisen.

7.2 Untersuchung zur Interaktion von IE2 mit Assoziationspartnern

Die Assoziation von IE2 mit viralen und potentiellen zellulären Proteinen läßt die Frage offen, ob IE2 direkt mit diesen Faktoren interagiert. Zur Prüfung einer möglichen direkten Interaktion von IE2 mit Assoziationspartnern könnten „GST pull-down“ Experimente durchgeführt werden. Durch Deletionen im IE2 Gen könnten dabei Domänen charakterisiert werden, die für die Interaktion verantwortlich sind. Eine weitere Möglichkeit, direkte Interaktion von Proteinen zu untersuchen, bietet das Hefe 2-Hybrid System.

7.3 Markieren IE2 Domänen präexistierende virale Replikationsorte der Insektenzelle?

Nach der Freisetzung viraler Genome in das Nukleoplasma kann sowohl für Herpesviren als auch für Adenoviren die Initiation der viralen Replikation an einer limitierten Anzahl nukleärer Domänen nachgewiesen werden (Maul, 1998). Diese Beobachtung führte zur Depot-Hypothese, daß virale Genome gerichtet zu präexistierenden Domänen transportiert werden, um aus dieser Umgebung Vorteile für die eigene Replikation zu ziehen (Maul, 1998). Für die Infektion des Kernpolyedervirus *Bombyx mori* wurde in diesem Zusammenhang die

Anzahl der Replikationszentren in Abhängigkeit zur Infektionsmultiplizität bestimmt (Okano et al., 1999). Dabei wurde ein Plateau von 15 Replikationszentren pro Zellkern auch bei hohen Infektionsmultiplizitäten nicht überschritten. Als Marker für virale Replikationszentren im Zellkern diente das Protein IE1, das während der gesamten viralen Replikation mit BrdU markierten Replikationszentren kolokalisiert. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, daß limitierte präexistierende Replikationsorte auch in Insektenzellen vorkommen (Okano et al., 1999). Während der AcMNPV Infektion wird das virale Protein IE2 in Assoziation mit beginnender viraler Replikation beobachtet und spiegelt sich in der Kolokalisierung von IE2 und BrdU Signalen wider. Ob IE2 Domänen, die ab 2 h p.i. auftreten dabei präexistierende Replikationsstellen des Insektenzellkerns markieren, ist bisher unbekannt. Zur Untersuchung dieser Fragestellung könnten Lokalisierungsstudien an replikationsdefekten Viren durchgeführt werden. Dabei könnte der gleichzeitige Nachweis des IE2 Proteins und der viralen Genome durch indirekte Immunfluoreszenz bzw. über Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) Hinweise auf diese potentielle IE2 Funktion geben.

VI. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Lokalisierung der beiden baculoviralen Proteine IE2 und PE38, die nach transienter Expression mit nukleären Domänen assoziieren, in Beziehung zu zellulären oder virusinduzierten Kerndomänen zu setzen und dabei Informationen zu möglichen IE2 und PE38 Funktionen im Infektionsverlauf zu erhalten. Dazu wurden sowohl Immunfluoreszenzstudien als auch Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt.

Im Infektionsverlauf lokalisierte IE2 in der frühen Phase der Infektion in nukleären Domänen, die sich ab 12 h p.i. in fadenförmigen Strukturen organisierten. Dagegen lokalisierte PE38 überwiegend in granulären Kernstrukturen und nur teilweise in nukleären Domänen, die überwiegend 2 h p.i. auftraten. Kolokalisierungsstudien zeigten, daß IE2 und PE38 2 h p.i. in gemeinsamen Domänen lokalisierten, aus denen PE38 ab 4 h p.i. entlassen wurde. Mit Hilfe von Immunpräzipitationen konnte gezeigt werden, daß IE2 und PE38 nicht nur 2 h p.i., sondern bis 12 h p.i. gemeinsame Komplexe bildeten. Dabei spielte die Lokalisierung beider Proteine keine Rolle und wies auf eine Wechselwirkung zwischen IE2 und PE38 nicht nur während der frühen Phase der Infektion, sondern auch während der viralen Replikation hin.

Als Kandidaten für zelluläre Kerndomänen, die möglicherweise mit IE2 und PE38 assoziieren, wurden POD Kerndomänen ausgewählt, deren Hauptkomponente PML wie IE2 und PE38 zur Familie der RING-Finger Proteine gehört und in nukleären Domänen lokalisiert. Baculovirale Genprodukte könnten ähnlich wie frühe virale Proteine säugerspezifischer Viren gezielt mit PODs assoziieren. Da die Existenz POD homologer Strukturen in Insektenzellen noch unklar ist, wurde humanes PML zur Markierung potentieller POD Domänen der Insektenzellen exprimiert. Zur effizienten Expression von PML im Infektionsverlauf wurde ein rekombinantes Virus hergestellt, das PML unter der Kontrolle des pe38 Promotors exprimiert. In der frühen Phase der Infektion (4-8 h p.i.) kolokalisierten IE2 und PML in gemeinsamen Domänen. Diese Domänen wurden ab 12 h p.i. umstrukturiert und eine Kolokalisierung von IE2 und PML wurde nur noch selten beobachtet. Dabei schien IE2 nicht für die PML Umstrukturierung verantwortlich zu sein, da die transiente Koexpression von IE2 und PML zwar die Kolokalisierung beider Proteine zeigte, aber keine PML Umstrukturierung. Um die Assoziation von PML und PE38 zu testen, wurden Kolokalisierungsstudien in Insekten- und Säugerzellen durchgeführt und festgestellt,

daß PE38 wie IE2 sowohl mit heterolog exprimiertem als auch mit endogenem PML assoziierte. Diese Beobachtungen wiesen auf eine mögliche Konservierung POD homologer Kernstrukturen in Insektenzellen hin. Im Einklang mit dieser Hypothese stand die Beobachtung, daß transient exprimiertes PML ähnlich wie PML im Säugersystem endogenes SUMO der Insektenzelle in PML markierte Domänen rekrutierte. Eine potentielle Modifizierung des PML Proteins in Insektenzellen wurde auf Proteinebene untersucht. Dabei wurden höhermolekulare, möglicherweise modifizierte PML Signale spät im Infektionsverlauf nachgewiesen. Damit scheinen sowohl PML Modifizierungsmechanismen als auch das PML interagierende Protein SUMO in Insektenzellen konserviert zu sein.

Neben der Assoziation von IE2 und PE38 mit potentiellen zellulären Domänen wurde auch ihre Lokalisierung im Bezug auf virusinduzierte Domänen untersucht. Neben den viralen IE2 und PE38 Kerndomänen 2 h p.i. stellen virale Replikationszentren markante virusinduzierte Kerndomänen dar. Sie können durch den Einbau von BrdU oder durch permanente Replikationsfaktoren markiert werden. Ab 4 h p.i. wurden virale Replikationszentren in einzelnen Zellen als distinkte Kerndomänen nachgewiesen, die mit fortschreitender Infektion an Größe zunahmten. IE2 kolokalisierte während der frühen Phase der viralen Replikation (4-6 h p.i.) mit diesen virusinduzierten Domänen. Da eine Assoziation in der späten Phase der viralen Replikation nicht mehr beobachtet werden konnte, könnte IE2 eine Funktion bei der Initiation der Replikation oder bei sehr frühen Prozessen der viralen Replikation besitzen. Weitere Hinweise auf eine potentielle IE2 Funktion während der viralen Replikation lieferte die Kopräzipitation des replikationsassoziierten Proteins DBP 6 h p.i. Außerdem kopräzipitierte zu diesem Zeitpunkt PE38 mit IE2 und DBP in gemeinsamen Komplexen. Diese Beobachtung könnte mit der stimulierenden Wirkung von PE38 und IE2 auf die virale Replikation einhergehen.

Diese Studien zeigen erstmals die Eigenschaft der baculoviralen Faktoren IE2 und PE38, sowohl mit zellulären als auch mit virusinduzierten Kernstrukturen zu assoziieren. Sie eröffnen damit neue IE2 und PE38 Aufgabenfelder und bilden die Basis für weitere Funktionsanalysen. Außerdem bieten sie durch die Assoziation von IE2 und PE38 mit PML markierten Domänen das Baculovirus als System zur Charakterisierung potentieller PODs der Insektenzellen an.

VII. Literaturverzeichnis

Ahn, J. H., and G. S. Hayward. 1997.

The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells.
J. Virol. 17:4599-4613.

Ascoli, C. A., and G. G. Maul. 1991.

Identification of a novel nuclear domain.
J. Cell Biol. 112:785-795.

Ayres, M. D., S. C. Howard, J. Kuzio, M. Lopez-Ferber, and R. D. Possee. 1994.

The complete DNA sequence of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus.
Virology 202:586-605.

Banerji, J., S. Rusconi, and W. Schaffner. 1981.

Expression of beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences.
Cell 27:299-308.

Berget, S. M., C. Moore, and P. A. Sharp. 1977.

Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 14:3171-3175.

Berk, A. J., and P. A. Sharp. 1978.

Structure of the adenovirus 2 early mRNAs.
Cell 14:695-711.

Black, B. C., L. A. Brennan, P. M. Dierks, and I. A. Gard. 1997.

Commercialization of Baculoviral Insecticides.
In: The Baculoviruses (L. K. Miller, Ed.), pp. 237-266. Plenum Press, New York.

Blissard, G. W., and J. R. Wenz. 1992.

Baculovirus GP64 protein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion.
J. Virol. 66:6829-6835.

Blissard, G. W. 1996.

Baculovirus-insect cell interactions.
Cytotechnology. 20:73-93.

Boddy, M. N., K. Howe, L. D. Etkin, E. Solomon, and P. S. Freemont. 1996.

PIC1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia.
Oncogene 13:971-982.

Borden, K. L. B., M. N. Boddy, J. Lally, N. J. O'Reilly, S. Martin, K. Howe, E. Solomon, and P. S. Freemont. 1995.

The solution structure of the RING finger domain from the acute promyelocytic leukaemia proto-oncogene PML.
EMBO J. 14:1532-1541.

Borden, K. L. B. 2000.

RING Domains: Master Builders of Molecular Scaffolds?
J. Mol. Biol. 295:1103-1112.

Boyce, F. M., and N. L. Bucher. 1996.

Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:2348-2352.

Bradford, M. M. 1976.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 72:248-254.

Braunagel, S. C., R. Parr, M. Belyavki, and M. D. Summers. 1998.

Autographa californica nucleopolyhedrovirus infection results in Sf9 cell cycle arrest at G2/M phase.
Virology 244:195-211.

Bravo, R., and H. McDonald-Bravo. 1987.

Existence of two populations of cyclin/proliferation cell nuclear antigen during the cell cycle. Association with DNA replication sites.
J. Cell Biol. 105:1549-1554.

Burand, J. P., M. D. Summers, and G. E. Smith. 1980.

Transfection with baculovirus DNA.
Virology 101:286.

Carson, D. D., L. A. Guarino, and M. D. Summers. 1988.

Functional mapping of an AcNPV immediate early gene which augments expression of the IE-1 trans-activated 39K gene.
Virology 162:444-451.

Carstens, E. B., S. T. Tjia, and W. Doerfler. 1979.

Infection of Spodoptera frugiperda cells with Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. I. Synthesis of intracellular proteins after virus infection.
Virology 99:368-398.

Carvalho, T., J. S. Seeler, K. Öhman, P. Jordan, U. Pettersson, G. Akusjärvi, M. Carmo-Fonseca, and A. Dejean. 1995.

Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies.
J. Cell Biol. 131:45-56.

Charlton, C. A., and L. E. Volkman. 1991.

Sequential rearrangement and nuclear polymerization of actin in baculovirus-infected cells.
J. Virol. 65:1219-1227.

Chow, L. T., R. E. Gelinas, T. R. Broker, and R. J. Roberts. 1977.

An amazing sequence arrangement at the 5'ends of adenovirus 2 messenger RNA.
Cell 12:1-8.

Clem, R. J. 1997.

Regulation of programmed cell death by baculoviruses.
In: The Baculoviruses (L. K. Miller, Ed.), pp. 237-266. Plenum Press, New York.

de Bruyn Kops, A., and D. M. Knipe. 1988.

Formation of DNA replication structures in herpes virus-infected cells requires a viral DNA binding protein.
Cell 55:857-868.

de The, H., C. Lavau, A. Marchio, C. Chomienne, L. Degos, and A. Dejean. 1991.

The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR.
Cell 66:675-684.

Doucas, V., A. M. Ishov, A. Romo, H. Juguilon, M. D. Weitzman, R. M. Evans, and G. G. Maul. 1996.

Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure.
Genes Dev. 10:196-207.

- Duprez, E., A. J. Saurin, J. M. Desterro, V. Lallemand-Breitenbach, K. Howe, M. N. Boddy, E. Solomon, H. de The, R. T. Hay, and P. S. Freemont. 1999.**
SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation.
J. Cell Sci. 112:381-93.
- Dyck, J. A., G. G. Maul, W. H. Miller Jr., J. Don Chen, A. Kakizuka, and R. M. Evans. 1994.**
A novel macromolecular structure is a target of the promyelocytic-retinoic acid receptor oncoprotein.
Cell 76:333-343.
- Engelhard, E. K., L. N. W. Kam-Morgan, J. O. Washburn, and L. E. Volkman. 1994.**
The insect tracheal system: A conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227.
- Evans, J. T., and G. F. Rohrmann. 1997.**
The baculovirus single-stranded DNA binding protein, LEF-3, forms a homotrimer in solution.
J. Virol. 71:3574-3579.
- Everett, R. D., and G. G. Maul. 1994.**
HSV-1 IE protein Vmw110 causes redistribution of PML.
EMBO J. 13:5062-5069.
- Everett, R. D., M. Meredith, A. Orr, A. Cross, M. Kathoria, and J. Parkinson. 1997.**
A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein.
EMBO J. 16:566-577.
- Everett, R. D., P. Freemont, H. Saitoh, M. Dasso, A. Orr, M. Kathoria, and J. Parkinson. 1998a.**
The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw110- and proteasome-dependent loss of several PML isoforms.
J. Virol. 72:6581-6591.
- Everett, R. D., A. Orr, and C. M. Preston. 1998b.**
A viral activator of gene expression functions via the ubiquitin-proteasome pathway.
EMBO J. 24:7161-7169.
- Everett, R. D., P. Lomonte, T. Sternsdorf, R. van Driel, and A. Orr. 1999.**
Cell cycle regulation of PML modification and ND10 composition.
J. Cell Sci. 112:4581-4588.
- Federici, B. A. 1997.**
Baculovirus Pathogenesis.
In: *The Baculoviruses* (L. K. Miller, Ed.), pp. 33-59. Plenum Press, New York.
- Flipsen, J. T. M., J. W. M. van Lent, R. W. Goldbach, and J. M. Vlak. 1993.**
Expression of polyhedrin and p10 in the midgut of *AcMNPV*-infected *Spodoptera exigua* larvae: An Immunoelectron microscope investigation.
J. Invertebr. Pathol. 61:17-23
- Freemont, P. S., I. M. Hanson, and J. Trowsdale. 1991.**
A novel cysteine-rich sequence motif.
Cell 64:483-484.
- Friesen, P. D. 1997.**
Regulation of baculovirus early gene expression.
In: *The Baculoviruses* (L. K. Miller, Ed.), pp. 141-170. Plenum Press, New York.

Friesen, P. D., and L. K. Miller. 1986.

The regulation of baculovirus gene expression.

In: *The Molecular biology of baculoviruses* (W. Doerfler, and P. Böhm, Eds.), pp. 31-49. Springer, Berlin.

Fuchs, L. Y., M. S. Woods, and R. F. Weaver. 1983.

Viral transcription during *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infection: a novel RNA polymerase induces in *Spodoptera frugiperda* cells.

J. Virol. 48:641-646.

Gardiner, G. R., and H. Stockdale. 1975.

Two tissue culture media for production of lepidopteran cells and nuclear polyhedrosis viruses.

J. Invertebr. Pathol. 25:363-370.

Gearing, G. R., and R. D. Possee. 1990.

Functional analysis of a 603 nucleotide open reading frame upstream of the polyhedrin gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus.

J. Gen. Virol. 71:251-262.

Goddard, A. D., J. Borrow, P. S. Freemont, and E. Solomon. 1991.

Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia.

Science 254:1371-1374.

Goldfarb, D. S., J. Gariepy, G. Schoolnik, and R. D. Kornberg. 1986.

Synthetic peptides as nuclear localization signals.

Nature 322:641-644.

Gomi, S., C. E. Zhon, W. Yih, K. Majima, and S. Maeda. 1997.

Deletion analysis of four of eighteen late gene expression factor gene homologues of the baculovirus BmNPV.

Virology 230:35-47.

Gomi, S., K. Majima, and S. Maeda. 1999.

Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus.

J. Gen. Virol. 80:1323-1337.

Grotzinger, T., K. Jensen, and H. Will. 1996.

The interferon (IFN)-stimulated gene Sp100 promoter contains an IFN-gamma activation site and an imperfect IFN-stimulated response element which mediate type I IFN inducibility.

J. Biol. Chem. 271:25253-60.

Grula, M. A., P. L. Buller, and R. F. Weaver. 1981.

α -Amanitin-resistant viral RNA synthesis in nuclei isolated from nuclear polyhedrosis virus-infected *Heliothis zea* larvae and *Spodoptera frugiperda* cells.

J. Virol. 38:916-921.

Guarino, L. A., M. A. Gonzalez, and M. D. Summers. 1986.

Complete sequence and enhancer function of the homologous DNA regions of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus.

J. Virol. 60:224-229.

Guarino, L. A., B. Xu, J. Jing, and W. Dong. 1998.

A virus encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells.

J. Virol. 72:7985-7991.

Guldner, H. H., C. Szosteki, T. Grotzinger, and H. Will. 1992.

IFN enhance expression of SP100, an autoantigen of biliary cirrhosis.

J. Immunol. 149:4067-4073.

Hanahan, D. 1985.

Techniques for transformation of *E. coli*.

In: DNA Cloning, Volume I (D. M. Glover, Ed.). IRL Press, Oxford, UK.

Hang, X., W. Dong, and L. A. Guarino. 1995.

The *lef-3* gene of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus encodes a single-stranded DNA-binding protein.

J. Virol. 69:3924-3928.

Harlow, E., and D. Lane. 1988.

Antibodies: A Laboratory Manual.

Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

He, L. Z., T. Merghoub, and P. P. Pandolfi. 1999.

In vivo analysis of the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia in the mouse and its therapeutic implications.

Oncogene 18:5278-5292.

Hink, W. F. 1970.

Established insect cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*.

Nature 226:466-467.

Hochuli, E., H. Döbli, and A. Schache. 1987.

New metal chelate absorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues.

J. Chromatography 411:177-184.

Hodges, M., C. Tissot, C. Howe, D. Grimwade, and P. S. Freemont. 1998a.

Structure, organization, and dynamics of the promyelocytic leukemia protein nuclear bodies.

Am. J. Hum. Genet. 63:297-304.

Hodges, M., C. Tissot, and P. S. Freemont. 1998b.

Protein regulation: Tag wrestling with relatives of ubiquitin.

Curr. Biol. 8:R749-R752.

Hofmann, C., V. Sandig, G. Jennings, M. Rudolph, P. Schlag, and M. Strauss. 1995.

Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:10099-10103.

Hofmann, C., and M. Strauss. 1998.

Baculovirus-mediated gene transfer in the presence of human serum or blood facilitated by inhibition of the complement system.

Gene Therapy 5:531-536.

Hofmann, H., S. Flöss, and T. Stamminger. 2000.

Covalent modification of the transactivator protein IE2-p86 of human cytomegalovirus by conjugation to the ubiquitin-homologous proteins SUMO-1 and hSmt3b.

J. Virol. 74:2510-2524.

Ishov, A. M., and G. G. Maul. 1996.

The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition.

J. Cell Biol. 134:815-826.

Ishov, A. M., R. M. Stenberg, and G. G. Maul. 1997.

Human cytomegalovirus immediate early interaction with host nuclear structures: definition of an immediate transcript environment.

J. Cell Biol. 138:5-16.

- Jarvis, D. L., D. A. Bohlmeier, and A. Garcia Jr. 1991.**
Requirements for nuclear localization and supramolecular assembly of a baculovirus polyhedrin protein.
Virology 185:795-810.
- Jentsch, S., and G. Pyrowolakis. 2000.**
Ubiquitin and its kin: how close are the family ties?
Trends Cell Biol. 10:335-342.
- Kakizuka, A., W. H. Miller Jr., K. Umesono, R. P. Warrell Jr., S. R. Frankel, V. V. Murty, E. Dmitrovsky, and R. M. Evans. 1991.**
Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML.
Cell 66:663-674.
- Kalderon, D., W. D. Richardson, A. F. Markham, and A. E. Smith. 1984.**
Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen.
Nature 311:33-38.
- Kamitani, T., K. Kito, H. P. Nguyen, H. Wada, T. Fukuda-Kamitani, and E. T. Yeh. 1998.**
Identification of three major sentrinization sites in PML.
J. Biol. Chem. 273:26675-26682.
- Keddie, B. A., G. W. Aponte, and L. K. Volkman. 1989.**
The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host.
Science 243:1728-1730.
- Kelly, C., R. van Driel, and G. W. Wilkinson. 1995.**
Disruption of PML-associated nuclear bodies during human cytomegalovirus infection.
J. Gen. Virology 76:2887-2893.
- King, L. A., and R. D. Possee. 1992.**
The baculovirus expression system: a laboratory guide.
Chapman & Hall, London.
- Knebel-Mörsdorf, D., J. T. M. Flipsen, R. Roncarati, F. Jahnel, A. W. F. Kleefsman, and J. M. Vlak. 1996.**
Baculovirus infection of *Spodoptera exigua* larvae: lacZ expression driven by promoters of early genes pe38 and me53 in larval tissue.
J. Gen. Virol. 77:815-824.
- Koken, M. H., F. Puvion-Dutilleul, V. Viron, G. Linares-Cruz, N. Stuurman, L. de Jong, D. Szostecki, F. Calvo, C. Chomienne, and H. de The. 1994.**
The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic-acid reversible fashion.
EMBO J. 13:1073-1083.
- Kool, M., C. Ahrens, R. W. Goldbach, G. F. Rohrmann, and J. M. Vlak. 1994.**
Identification of genes involved in DNA replication of the *Autographa californica* baculovirus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11212-11216.
- Korioth, F., G. G. Maul, B. Plachter, T. Stamminger, and J. Frey. 1996.**
The nuclear domain 10 (ND10) is disrupted by the human cytomegalovirus gene product IE1.
Exp. Cell Res. 229:155-158.
- Krappa, R., and D. Knebel-Mörsdorf. 1991.**
Identification of the very early transcribed baculovirus gene pe38.
J. Virol. 65:805-812.
- Krappa, R., R. Roncarati, and D. Knebel-Mörsdorf. 1995.**
Expression of PE38 and IE2, viral members of the C3HC4 finger family, during baculovirus infection: PE38 and IE2 localize to distinct nuclear regions.
J. Virol. 69:5287-5293.

- Laemmli, U. K. 1970.**
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4.
Nature 277:680.
- Lamond, A. I., and C. Earnshaw. 1998.**
Structure and function of the nucleus.
Science 280:547-553.
- Lanford, R. E., P. Kanda, and R. C. Kennedy. 1986.**
Induction of nuclear transport with a synthetic peptide homologous to the SV40 T antigen transport signal.
Cell 46:575-582.
- Lavau, C., A. Marchio, M. Fagioli, J. Jansen, B. Falini, P. Lebon, F. Grosveld, P. P. Pandolfi, P. G. Pelicci, and A. Dejean. 1995.**
The acute promyelocytic leukaemia-associated PML gene is induced by interferon.
Oncogene 11:871-876.
- Lehembre, F., P. Badenhorst, S. Müller, A. Travers, F. Schweisguth, and A. Dejean. 2000.**
Covalent modification of the transcriptional repressor tramtrack by the ubiquitin-related protein Smt3 in *Drosophila* Flies.
Mol. Cell. Biol. 20:1072-1082.
- Leppard, K. N., and R. D. Everett. 1999.**
The adenovirus type 5 E1b 55K and E4Orf3 proteins associate in infected cells and affect ND10 components.
J. Gen. Virology 80:997-1008.
- Lin, R. J., D. A. Egan, and R. M. Evans. 1999.**
Molecular genetics of acute promyelocytic leukemia.
TIG 15:179-184.
- Lovering, R., I. M. Hanson, K. L. B. Borden, S. Martin, N. A. O'Reilly, G. I. Evan, D. Rahman, D. J. C. Pappin, J. Trowsdale, and P. S. Freemont. 1993.**
Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2112-2116.
- Lu, A., and E. B. Carstens. 1993.**
Immediate-early baculovirus genes transactivate the p143 gene promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus.
Virology 195:710-718.
- Lu, A., and L. K. Miller. 1995.**
The roles of eighteen baculovirus late expression factor genes in transcription and DNA replication.
J. Virol. 69:975-982.
- Lu, A., P. J. Krell, J. M. Vlak, and G. F. Rohrmann. 1997.**
Baculovirus DNA Replication.
In: *The Baculoviruses* (L. K. Miller, Ed.), pp. 171-191. Plenum Press, New York.
- Lynn, D. E., and W. F. Hink. 1978.**
Infection of synchronized TN-368 cell cultures with alfalfa looper nuclear polyhedrosis virus.
J. Invertebr. Pathol. 32:1-5.
- Martens, J. W. M., M. M. van Oers, B. D. van de Bilt, P. Oudshoorn, and J. M. Vlak. 1995.**
Development of a baculovirus vector that facilitates the generation of p10-based recombinants.
J. Virol. Methods 52:15-19.

Maul, G. G., H. H. Guldner, and J. G. Spivack. 1993.

Modification of discrete nuclear domains induced by herpes simplex virus type 1 immediate early gene 1 product (ICP0).
J. Gen. Virology 74:2679-2690.

Maul, G. G., and R. D. Everett. 1994.

The nuclear location of PML, a cellular member of the C₃HC₄ zinc-binding domain protein family, is rearranged during herpes simplex virus infection by the C₃HC₄ viral protein ICP0.
J. Gen. Virol. 75:1223-1233.

Maul, G. G., E. Yu, A. M. Ishov, and A. L. Epstein. 1995.

Nuclear domain (ND10) associated proteins are also present in nuclear bodies and redistribute to hundreds of nuclear sites after stress.
J. Cell. Biochem. 59:498-513.

Maul, G. G., A. M. Ishov, and R. D. Everett. 1996.

Nuclear domain 10 as preexisting potential replication start sites of herpes simplex virus type-1.
Virology. 217:67-75.

Maul, G. G. 1998.

Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication.
BioEssays 20:660-667.

Maul, G. G., D. Negorev, P. Bell, and A. M. Ishov. 2000.

Review: Properties and assembly mechanism of ND10, PML bodies, or PODs.
J. Struct. Biol. 129:278-287.

McLachlin, J. R., and L. K. Miller. 1994.

Identification and characterization of vlf-1, a baculovirus gene involved in very late gene expression.
J. Virol. 68:7746-7756.

Melnick, A., and J. D. Licht. 1999.

Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their role in the pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia.
Blood 93:3167-3215.

Meredith, M., A. Orr, and R. D. Everett. 1994.

Herpes simplex virus type 1 immediate early protein Vmw110 binds strongly and specifically to a 135-kDa cellular protein.
Virology 200:457-469.

Mikhailov, V., A. L. Mikhailova, M. Iwanaga, S. Gomi, and S. Maeda. 1998.

Bombyx mori nucleopolyhedrosis virus encodes a DNA binding protein capable of destabilizing duplex DNA.
J. Virol. 72:3107-3116.

Miller, L. K. 1996.

Insect Viruses.
In: Fields Virology, Third Edition (B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, et al. Eds.), pp. 533-556.
Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Miller, L. K., W. J. Kaiser, and S. Seshagiri. 1998.

Baculovirus regulation of apoptosis.
Seminars in Virol. 8:445-452.

Monsma, S. A., and G. W. Blissard. 1995.

Identification of a membrane fusion domain and an oligomerization domain in the baculovirus GP64 fusion protein.
J. Virol. 69:2583-2595.

Monsma, S. A., and A. G. P. Oomens. 1996.

The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell to cell transmission of infection.
J. Virol. 70:4608-4616.

Moreau, P., R. Hen, B. Wasylyk, R. Everett, M. P. Gaub, and P. Chambon. 1981.

The SV40 72 base pair repeat has a striking effect on gene expression both in SV40 and other chimeric recombinants.
Nucleic Acids Res. 9:6047-6068.

Mu, Z. M., K. V. Chin, J. H. Liu, G. Lozano, and K. S. Chang. 1994.

PML, a growth suppressor disrupted in acute promyelocytic leukemia.
Mol. Cell. Biol. 14:6858-6867.

Müller, S., M. J. Matunis, and A. Dejean. 1998.

Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus.
EMBO J. 17:61-70.

Müller, S., and A. Dejean. 1999.

Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and SP100 proteins, correlating with nuclear body disruption.
J. Virol. 73:5137-5143.

Murges, D., 1997.

Diplomarbeit, Universität zu Köln, 1997.

Nakamura, H., T. Morita, and C. Sato. 1986.

Structural organization of replicon domains during DNA synthetic phase in the mammalian nucleus.
Exp. Cell Res. 165:291-297.

Nakayasu, H., and R. Berezney. 1989.

Mapping replication sites in the eukaryotic nucleus.
J. Cell Biol. 108:1-11.

Okano, K., S. Mikhailov and S. Maeda. 1999.

Colocalization of baculovirus IE-1 and two DNA-binding proteins, DBP and LEF-3, to viral replication factories.
J. Virol. 73:110-119.

Ooi, B. G., and L. K. Miller. 1988.

Regulation of host RNA levels during baculovirus infection.
Virology 166:515-523.

O'Reilly, D. R., L. K. Miller, and V. A. Luckow. 1992.

Baculovirus expression vectors: a laboratory manual.
W. H. Freeman and Company, New York.

Passarelli, A. L., and L. K. Miller. 1993.

Three baculovirus genes involved in late and very late gene expression: ie-1, ie-n, and lef-2.
J. Virol. 67:2149-2158.

Potter, K. N., and L. K. Miller. 1980.

Transfection of two invertebrate cell lines with DNA of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus.
J. Invertebr. Pathol. 36:431.

Prikhod'ko, E. A., and L. K. Miller. 1998.

Role of baculovirus IE2 and its RING finger in cell cycle arrest.
J. Virol. 72:684-692.

Prikhod'ko, E. A., and L. K. Miller. 1999.

The baculovirus PE38 protein augments apoptosis induced by transactivator IE1.
J. Virol. 73:6691-6699.

Prikhod'ko, E. A., A. Lu, J. A. Wilson, and L. K. Miller. 1999.

In vivo and in vitro analysis of baculovirus ie-2 mutants.
J. Virol. 73:2460-2468.

Quadt, I., 2000.

Diplomarbeit, Universität zu Köln, 2000.

Rice, W. C., and L. K. Miller. 1986.

Baculovirus transcription in the presence of inhibitors and in nonpermissive *Drosophila* cells.
Virus Research 6:155-172.

Rohrmann, G. F. 1986.

Polyhedrin structure.
J. Gen. Virology 67:1499-1513.

Rohrmann, G. F. 1992.

Baculovirus structural proteins.
J. Gen. Virol. 73:749-61.

Roncarati, R., and D. Knebel-Mörsdorf. 1997.

Identification of the early actin-rearrangement-inducing factor gene, arif-1, from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus.
J. Virol. 71:7933-7941.

Saitoh, H., R. T. Pu, and M. Dasso. 1997.

SUMO-1: wrestling with a new ubiquitin-related modifier.
TIBS 22: 374-376.

Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977.

DNA sequencing with chain-terminating-inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467.

Scheer, U., and D. Weisenberg. 1994.

The nucleolus.
Curr. Opin. Cell Biol. 6:354-359.

Seeler, J. S., and A. Dejean. 1999.

The PML nuclear bodies: actors or extras?
Curr. Opin. Gen. Dev. 9:362-367.

Seipel, K., O. Georgiev, and W. Schaffner, 1992.

Different activation domains stimulate transcription from remote (,enhancer') and proximal (,promoter') positions.
EMBO J. 11:4961-4068.

Spector, D. L. 1996.

Nuclear organization and gene expression.
Exp. Cell Res. 229:189-197.

Stadler, M., M. K. Chelbi-Alix, M. H. Koken, L. Venturini, C. Lee, A. Saib, F. Quignon, L. Pelicano, M. C. Guillemin, C. Schindler, and H. de The. 1995.

Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element.
Oncogene 11:2565-2573.

Sternsdorf, T., T. Grötzinger, K. Jensen, and H. Will. 1997a.

Nuclear dots: actors at many stages.
Immunobiol. 198:307-331.

Sternsdorf, T., K. Jensen, and H. Will. 1997b.

Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and SP100 by PIC1/SUMO1.
J. Cell. Biol. 139:1621-1634.

Sternsdorf, T., K. Jensen, B. Reich, and H. Will. 1999.

The nuclear dot protein SP100, characterization of domains, necessary for dimerization, subcellular localization, and modification by small ubiquitin-like modifiers.
J. Biol. Chem. 274:12555-12566.

Stewart, L. M. D., M. Hirst, M. Lopez-Ferber, A. T. Merryweather, P. J. Cayley, and R. D. Possee. 1991.

Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene.
Nature 352:85-88.

Stoltz, D. B., C. Pavan, and A. B. Da Cunha. 1973.

Nuclear polyhedrosis virus, a possible example of de novo intranuclear membrane morphogenesis.
J. Gen. Virol. 19:145-150.

Stüber, D., W. Bannwarth, J. R. L. Pink, R. H. Meloen, and H. Matile. 1990.

New B cell epitopes in the Plasmodium falciparum malaria circumsporozoite protein.
Eur. J. Immunol. 20:819-824.

Stuurman, N., A. De Graaf, A. Floore, A. Josso, B. Humbel, L. De Jong, and R. van Driel. 1992.

A monoclonal antibody recognizing nuclear matrix-associated nuclear bodies.
J. Cell Sci. 101:773-784.

Stuurman, N., A. Floore, E. Middelkoop, R. van Driel, and L. de Jong. 1997.

PML shuttles between nuclear bodies and the cytoplasm.
Cell Mol. Biol. Lett. 2:137-150.

Terris, B., V. Baldin, S. Dubois, C. Degott, J. F. Flejou, D. Henin, and A. Dejean. 1995.

PML nuclear bodies are general targets for inflammation and cell proliferation.
Cancer Res. 55:1590-1597.

Tjia, S. T., E. B. Carstens, and W. Doerfler. 1979.

Infection of Spodoptera frugiperda cells with Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. II. The viral DNA and kinetics of its replication.
Virology 99:399-409.

Todd, J. W., and A. L. Passarelli. 1995.

Eighteen baculovirus genes including lef-11, p35, 39K, and p47, support late gene expression.
J. Virol. 69:968-974.

Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979.

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-4354.

Vail, P., G. Sutter, D. Jay, and D. Gough. 1971.

Reciprocal infectivity of nuclear polyhedrosis viruses of the cabbage looper and the alfalfa looper.
J. Invertebr. Pathol. 17:383-388.

van Oers, M. M., J. T. M. Flipsen, C. B. E. M. Reusken, E. L. Sliwinsky, R. W. Goldbach, and J. M. Vlak. 1993.

Functional domains of the p10 protein of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus.
J. Gen. Virol. 74:563-574.

- van Oers, M. M., J. M. Vlak, H. O. Voorma, and A. A. Thomas. 1999.**
Role of the 3' untranslated region of baculovirus p10 mRNA in high-level expression of foreign genes.
J. Gen. Virol. 80:2253-2262.
- Vaughn, J. L., R. H. Goodwin, G. J. Tompkins, and P. McCawley. 1977.**
The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda*.
In Vitro 13:213-217.
- Volkman, L. E., and B. A. Keddie. 1990.**
Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis.
Seminars in Virol. 1:249-256.
- Weis, K., S. Rambaud, C. Lavau, J. Jansen, T. Carvalho, M. Carmo-Fonesca, A. Lamond, and A. Dejean. 1994.**
Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells.
Cell 76:354-356.
- Williams, G. V., D. Z. Rohel, J. Kuzio, and P. Faulkner. 1989.**
A cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion-deletion mutants.
J. Gen. Virol. 70:187-202.
- Williams, G. V., and P. Faulkner. 1997.**
Cytological changes and viral morphogenesis during baculovirus infection.
In: *The Baculoviruses* (L. K. Miller, Ed.), pp. 61-107. Plenum Press, New York.
- Wood, H. A. 1980.**
Autographa californica nuclear polyhedrosis virus-induced proteins in tissue culture.
Virology 120:21-27.
- Wu, Y., and E. B. Carstens. 1998.**
A baculovirus single-stranded DNA binding protein, LEF-3, mediates the nuclear localization of the putative helicase P134.
Virology 247:32-40.
- Xeros, N. 1956.**
The virogenic stroma in nuclear and cytoplasmic polyhedrosis.
Nature 128:412-413.
- Yoo, S., and L. A. Guarino. 1994a.**
Functional dissection of the ie2 gene product of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus.
Virology 202:164-172.
- Yoo, S., and L. A. Guarino. 1994b.**
The *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus ie2 gene encodes a transcriptional regulator.
Virology 202:746-753.
- Zhong, S., P. Salomoni, and P. P. Pandolfi. 2000.**
The transcriptional role of PML and the nuclear body.
Nature Cell Biol. 2:E85-E90.

VIII. Kurzzusammenfassung

Nach transienter Expression in Insektenzellen lokalisieren die frühen baculoviralen Genprodukte IE2 und PE38 des Kernpolyedervirus *Autographa californica* in distinkten Kerndomänen. Um diesen Kerndomänen eine funktionelle Bedeutung zuweisen zu können, wurde in dieser Arbeit die Assoziation von IE2 und PE38 mit zellulären oder virusinduzierten Kerndomänen im Infektionsverlauf untersucht.

In der frühen Phase der Infektion lokalisierte IE2 in nukleären Domänen, während PE38 nur selten Kerndomänen ausbildete. Trotz dieser Unterschiede gibt es Evidenz für die Interaktion von IE2 und PE38 in gemeinsamen Kernkomplexen. Das Ziel früher viraler Genprodukte säugerspezifischer Viren ist das Promyelozytische Leukämie Protein (PML), das in Säugerzellen in nukleären Multiproteindomänen, sog. ND10/PODs, lokalisiert. Ob frühe baculovirale Proteine ein ähnliches Potential besitzen, wurde mit Hilfe eines rekombinanten Virus, das humanes pml Gen in Insektenzellen exprimiert, untersucht. Dabei wurde die Assoziation von IE2 und PML in der frühen Phase der Infektion gefolgt von einer Umstrukturierung beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt kolokalisierte IE2 nicht nur mit PML, sondern auch mit viralen Replikationszentren. Allerdings wurde keine signifikante Kolokalisierung der PML Signale mit Replikationszentren nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung dieser Diskrepanz könnte die Existenz unterschiedlicher IE2 Domänen, die entweder mit PML oder früher viraler Replikation assoziiert sind, darstellen. Mit zunehmender Replikation nahm die Assoziation von IE2 mit viralen Replikationszentren ab. Deshalb lag die Vermutung nahe, daß IE2 eine Funktion bei sehr frühen Prozessen der viralen Replikation, beispielsweise der Initiation, besitzt.

Zusammenfassend zeigen diese Daten erstmals, daß das frühe baculovirale Protein IE2 das Potential besitzt, im Infektionsverlauf mit verschiedenen Partnern viraler oder zellulärer Natur zu assoziieren. Dabei ist die Assoziation mit PML ein erster Hinweis auf die Existenz POD homologer Strukturen in Insektenzellen.

IX. Abstract

The early gene products IE2 and PE38 of *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus localize to distinct nuclear domains after transient expression. Here, the nuclear localization pattern and the putative association of IE2 and PE38 with cellular or virus-induced nuclear domains during the infection cycle have been determined to shed light on the functional background of IE2 and PE38 nuclear domains. During infection IE2 was always localized to nuclear domains while PE38 was partly present in nuclear dots. Confocal imaging indicated co-localization of IE2 and PE38 to common domains at 2 h p.i. Immunoprecipitations with IE2 or PE38 specific antibodies showed that IE2 and PE38 form common nuclear complexes between 2 and 12 h p.i. suggesting the interaction of both proteins during the early phase of infection and during viral replication. Since the promyelocytic leukemia protein (PML) which localizes to distinct nuclear multi-protein complexes termed ND10/PODs in mammalian cells functions as a target for immediate early virus proteins, we have investigated whether baculovirus proteins act similarly. Transiently expressed IE2 and PE38 were found to be associated with endogenous PML in the mammalian cell line BHK21. Infection with a recombinant virus that expresses the human pml gene in insect cells, reveals IE2 and PML to be co-localized during the early phase of infection followed by a redistribution of both proteins. Dominant virus-induced nuclear domains are viral replication factories, which can be labeled by bromodeoxyuridine incorporation. Double staining of infected cells showed overlapping IE2 and BrdU signals at 4-6 h p.i. that were less obvious later on. This observation led to the hypothesis that IE2 might have a function in initiating virus genome replication or in very early events of virus replication. Taken together these results provide first evidence, that the early baculovirus protein IE2 has the potential to associate different cellular or viral partners during the infection cycle. The association of IE2 with at least one component of mammalian PODs during virus infection suggests the existence of POD like structures in insect cells.

X. Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von den unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung - abgesehen von den unten genannten zur Veröffentlichung eingereichten Teilpublikationen - vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Dagmar Knebel-Mörsdorf betreut worden.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden unter folgendem Titel zur Veröffentlichung eingereicht:

Murges, D., I. Quadt, J. Schroer, and D. Knebel-Mörsdorf. 2000.

Dynamic nuclear localization of the baculovirus proteins IE2 and PE38 during the infection cycle: The promyelocytic leukemia protein co-localizes to IE2.

Exp.Cell Res. in press.

Köln, den

Daniela Murges

XI. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Murges, Daniela

*14. März 1972 in Prüm

ledig, keine Kinder

Diplom-Biologin

Schulischer Werdegang:

1978 - 1982 Grundschule St. Josef, Stadtkyll

1982 - 1991 Regino-Gymnasium, Prüm
Abschluß: Erwerb der allgemeinen Hochschulreife (Abitur)

Studium und Beruf:

Oktober 1991 - Hochschulstudium: Universität zu Köln, Mathematisch-
März 1997 Naturwissenschaftliche Fakultät, Studiengang: Diplom-Biologie
Hauptfach: Genetik
Nebenfächer: Biochemie, Pharmakologie
Diplomarbeit: Promotoraktivierung und Lokalisierung früher
baculoviraler Faktoren.
Abschluß: Diplom-Biologin

März 1997 - Mitarbeiterin im Institut für Genetik, Universität zu Köln,
Dezember 1998 Abteilung: Prof. Dr. W. Doerfler
Arbeitsgruppe: Prof. Dr. D. Knebel-Mörsdorf

ab Januar 1999 Mitarbeiterin im Max-Planck-Institut für Neurologische Forschung,
Köln
Arbeitsgruppe: Prof. Dr. D. Knebel-Mörsdorf

ab März 1999 Förderung durch die Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften e.V.

XII. Danksagung

Mein erstes Dankeschön geht an Frau Prof. Dr. Dagmar Knebel-Mörsdorf für die Betreuung dieser Dissertation. Ihre zahlreichen Anregungen und Ratschläge, nicht nur auf wissenschaftlicher Ebene, haben entscheidend zur Verwirklichung dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Walter Doerfler möchte ich für seine Diskussionsbereitschaft und für die Übernahme des Koreferats danken.

Weiterhin geht mein Dank an Dr. Achim Rziha und seine Mitarbeiter für die Herstellung der polyklonalen anti-IE2 und anti-PE38 Mausseren, ohne die ein großer Teil der Experimente nicht möglich gewesen wäre.

Für die Ratschläge und Hilfestellungen zur konfokalen Mikroskopie geht mein Dank an Francisco Rivero und Monika Pesch.

Allen Mitarbeitern des molekularbiologischen Labors des MPI für Neurologische Forschung möchte ich für viele nützliche Diskussionen, aufheiternde Gespräche und das gute Arbeitsklima danken. Ich danke Beate Windheuser-Weber für das zuverlässige Ansetzen und Autoklavieren von Lösungen und die Reinigung der Laborgeräte.

Für die Durchsicht des Manuskripts ein Dankeschön an Helga Arend, Mario Schelhaas, Stephan Dreschers und Michael Badorf.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, meinem Freund Torsten Mainz und Steffi Boeckle, die mir während der gesamten Promotion hilfreich zur Seite gestanden haben.