

Aus dem Bereich Innere Medizin
Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Der Lebenszyklus archetypischer und
rearrangierter BK-Polyomaviren und der
Einfluss von Wirkstoffen in einem neuen
in vitro Replikationssystem**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften**

der Medizinischen Fakultät der
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2019

vorgelegt von

Pascal Feld

geb. am 28.07.1989 in Püttlingen

Die experimentellen Arbeiten im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sigrun Smola am Institut für Virologie am Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg/Saar durchgeführt.

Tag der Promotion:

1. Oktober 2019

Dekan der medizinischen Fakultät:

Herr Prof. Dr. Michael Menger

Erstberichterstatte:

Herr Prof. Dr. Klaus Römer

Zweitberichterstatte:

Frau Prof. Dr. Sigrun Smola

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	1
2 Summary.....	3
3 Einleitung	4
3.1 Polyomaviren.....	4
3.2 Das BK-Polyomavirus	6
3.2.1 Epidemiologie und Übertragung	6
3.2.2 Genomaufbau.....	6
3.2.3 Nicht-kodierende Kontrollregion (NCCR).....	7
3.2.3.1 Funktion und Rearrangements.....	7
3.2.3.2 Die NCCR und der Transkriptionsfaktor AP-1	9
3.2.3.3 Weitere zelluläre Transkriptionsfaktoren	11
3.2.4 Virale Proteine und Kapsidaufbau	12
3.2.4.1 Frühe Proteine	12
3.2.4.2 Späte Proteine	14
3.2.4.3 Kapsidaufbau.....	15
3.2.5 Virale miRNA.....	16
3.2.6 Replikationszyklus	16
3.2.7 Persistenz	17
3.2.8 Zellkulturmodelle für die Replikation des BKPyV	18
3.2.9 BKPyV-assoziierte Erkrankungen und therapeutische Ansätze	19
3.2.9.1 Polyomavirus-assoziierte Nephropathie (PVAN)	19
3.2.9.2 Hämorrhagische Zystitis.....	20
3.2.9.3 Behandlung und Therapie.....	20
3.3 Zellzyklus.....	22
3.3.1 Definition und Phasen	22
3.3.2 Regulation des Übertritts in die S-Phase	22
3.4 Retinoide	23
3.4.1 Struktur und Klassifizierung.....	23
3.4.2 Zelluläre Funktionen	25
3.4.3 Retinoide als Medikamente	26
3.5 Ziele dieser Arbeit.....	28
4 Material und Methoden.....	29

4.1 Material.....	29
4.1.1 Zellkultur.....	29
4.1.1.1 Eukaryotische Zellen.....	29
4.1.1.2 Reagenzien für die Zellkultur.....	29
4.1.1.3 Zellkulturmedien.....	30
4.1.1.4 Medikamente	32
4.1.2 BKPyV-Stämme	32
4.1.3 Dunlop-Plasmid	32
4.1.4 Antikörper.....	33
4.1.5 Oligonukleotide.....	34
4.1.5.1 Reverse Transkription	34
4.1.5.2 PCR	34
4.1.5.3 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	35
4.1.6 Enzyme	35
4.1.7 Reagenziensysteme (Kits).....	36
4.1.8 Puffer.....	36
4.1.8.1 Isolation von RPTEC und FACS	36
4.1.8.2 Neutralrottest	36
4.1.8.3 Immunfluoreszenz.....	37
4.1.8.4 Durchflusszytometrie.....	37
4.1.8.5 Elektronenmikroskopie.....	37
4.1.8.6 PCR	37
4.1.8.7 Proteinextraktion	38
4.1.8.8 Westernblot.....	39
4.1.8.9 EMSA	40
4.1.8.10 Gelelektrophorese von Agarosegelen	41
4.1.9 Radionukleotide.....	41
4.1.10 Sonstige Reagenzien	41
4.1.11 Sonstige Materialien	43
4.1.12 Geräte	43
4.1.13 Software	44
4.2 Methoden.....	45
4.2.1 Zellkultur.....	45
4.2.1.1 Isolation von kortikalen Nierenzellen aus Nierengewebe.....	45

4.2.1.2 Isolation von Epithelzellen der proximalen Nierentubuli.....	45
4.2.1.3 Auftauen von Zellen	46
4.2.1.4 Kultivierung von 293TT Zellen.....	46
4.2.1.5 Kultivierung von RPTEC	47
4.2.1.6 Zellzahlbestimmung	47
4.2.1.7 Einfrieren von RPTEC.....	47
4.2.1.8 PCR zum Mykoplasmen-Nachweis	47
4.2.1.9 Neutralrotest	48
4.2.2 Viren und Infektionen.....	49
4.2.2.1 Anzucht archetypischer BKPyV Stämme in 293TT Zellen	49
4.2.2.2 Produktion des Dunlop-Genoms in E. coli	49
4.2.2.3 Anzucht von Dunlop-BKPyV in 293TT Zellen	50
4.2.2.4 Infektion von RPTEC.....	50
4.2.2.5 <i>Fluorescent Focus Assay</i>	51
4.2.2.6 Medikamententests	53
4.2.2.7 Elektronenmikroskopie.....	53
4.2.2.8 Transformationsassay.....	54
4.2.3 Weitere RNA/DNA-Methoden	55
4.2.3.1 Isolation viraler DNA	55
4.2.3.2 <i>Nested</i> PCR zur Genotypisierung von BKPyV Stämmen	55
4.2.3.3 Quantitative real-time PCR zur Viruslastbestimmung.....	56
4.2.3.4 RNA-Isolation.....	57
4.2.3.5 cDNA-Synthese aus mRNA	58
4.2.3.6 Quantitative PCR mit cDNA	59
4.2.4 Weitere Protein-Methoden.....	61
4.2.4.1 Durchflusszytometrie.....	61
4.2.4.2 Immunfluoreszenz.....	61
4.2.4.3 Proteinextraktion	62
4.2.4.4 Proteinbestimmung	62
4.2.4.5 Extraktion von Kernproteinen	62
4.2.4.6 Proteinbestimmung nach Bradford	63
4.2.4.7 SDS-PAGE und Western Blot	64
4.2.4.8 EMSA	65
4.2.5 Statistische Auswertung	67

5 Ergebnisse	68
5.1 Isolierte RPTEC exprimieren spezifische Marker	68
5.2 Anzucht von BKPyV Stämmen in 293TT Zellen	69
5.3 Quantifizierung der Infektiosität der Virusstämme	70
5.4 Die Replikation des BKPyV in primären RPTEC	72
5.4.1 Die Replikation ist abhängig vom Zellkulturmedium.....	72
5.4.2 Unterschiedliche Stämme des BKPyV replizieren in RPTEC verschiedener Spender	73
5.5 Charakterisierung der Virusstämme.....	75
5.5.1 Dunlop repliziert besser als WWM12.....	75
5.5.2 Beide Stämme sind passagierbar und produzieren infektiöse Nachkommen.....	77
5.5.3 Die Sequenz der NCCR des Archetyps ist stabil	79
5.6 Der Einfluss von Teriflunomid auf die Replikation des BKPyV	80
5.7 Die Interaktion des BKPyV mit der Regulation des Zellzyklus.....	82
5.7.1 Dunlop induziert die Expression von Cyclin E1/E2 und CDK1/2	82
5.7.2 WWM12 induziert die Expression von Cyclin E1/E2 und CDK1/2	83
5.7.2 Der CDK1-Inhibitor Ro-3306 inhibiert die Replikation von Dunlop und WWM12	85
5.7.3 Der WWM12-Stamm kann RPTEC nicht transformieren.....	86
5.8 Der Effekt der Retinoide auf die Replikation des BKPyV	87
5.8.1 ATRA inhibiert die Replikation des WWM12-Stamms.....	87
5.8.2 Acitretin inhibiert die Replikation des WWM12-Stamms	88
5.8.3 Adapalen inhibiert die Replikation des WWM12-Stamms stark.....	89
5.8.4 Bexaroten inhibiert die Replikation beider Stämme stark	90
5.8.5 Fenretinid inhibiert die Replikation beider Stämme stark.....	92
5.8.6 Abhängigkeit der Wirkung von Bexaroten und Fenretinid vom Applikationszeitpunkt.	94
5.9 Der Einfluss von Bexaroten und Fenretinid auf die Expression von Cyclin E und CDK1/295	
5.9.1 Dunlop-infizierte Zellen.....	95
5.9.2 WWM12-infizierte Zellen.....	98
5.10 Der Effekt von Bexaroten und Fenretinid auf die DNA-Bindeaktivität von AP-1	101
5.10.1 Die archetypische NCCR enthält potenzielle Bindestellen für AP-1	101
5.10.2 Die untersuchten Bindestellen sind durch PMA-Stimulation induzierbar	101
5.10.3 Bindestelle W ist in der BKPyV-NCCR konserviert	103
5.10.4 Bexaroten inhibiert die Bindung an die Bindestellen W und DII.....	105
5.10.5 Bexaroten inhibiert die Bindung an die Bindestellen W und DII direkt	106
6 Diskussion.....	111

6.1 Die Replikation des BKPyV in primären RPTEC	111
6.1.1 Archetypische BKPyV replizieren in primären RPTEC	111
6.1.2 Die Replikation archetypischer und rearrangierter BKPyV ist abhängig vom Zellkulturmedium	112
6.1.3 Die NCCR archetypischer BKPyV in primären RPTEC ist stabil	114
6.1.4 Der Dunlop-Stamm repliziert effizienter als der WWM12-Stamm	115
6.2 Therapieansätze zur Behandlung der BKPyV-Reaktivierung	117
6.2.1 Teriflunomid inhibiert die Replikation von WWM12 und Dunlop nur schwach	117
6.2.2 Das BKPyV aktiviert die Expression positiver Zellzyklusregulatoren	118
6.2.3 Ro-3306 ist für eine antivirale Therapie nicht geeignet	119
6.3 Die Wirkung der Retinoide auf die BKPyV-Replikation	120
6.3.1 Retinoide inhibieren die Replikation rearrangierter und archetypischer BKPyV	121
6.3.2 Der Einfluss der Retinoide auf die Zellzyklusregulation	124
6.4 Bexaroten inhibiert die Bindung von AP-1 an Bindestellen der NCCR	125
6.4.1 AP-1 kann an die archetypische NCCR binden	125
6.4.2 Bexaroten inhibiert die Bindung von AP-1 an die Bindestellen W und DII	127
6.5 Schlussfolgerung und Ausblick	132
7 Anhang	133
7.1 NCCR-Sequenz der Hauptspezies des BKPyV-Isolats M401	133
7.2 Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Virusstocks	133
7.3 Sequenz-Alignments der NCCR aller untersuchten Proben	135
7.4 Vorhergesagte AP-1 Bindestellen in NCCR-Sequenzen aus Vorarbeiten	142
8 Verzeichnisse	146
8.1 Abkürzungsverzeichnis	146
8.2 Abbildungsverzeichnis	151
8.3 Tabellenverzeichnis	153
8.4 Literaturverzeichnis	154
9 Danksagung	173
10 Lebenslauf und Publikationen	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Zusammenfassung

Bis zu 90% der Bevölkerung sind latent mit dem BK-Polyomavirus (BKPyV) infiziert. Auch wenn die Primärinfektion meist ohne gavierende Symptome verläuft, kann eine Reaktivierung des Virus in Menschen mit krankheits- oder medikamentenbedingter Immunsuppression schwere bis lebensbedrohliche Krankheiten auslösen. Am häufigsten von BKPyV-assoziierten Erkrankungen betroffen sind immunsupprimierte Patienten nach einer Nierentransplantation oder einer allogenen Stammzelltransplantation. Nach Nierentransplantationen führt eine Reaktivierung des BKPyV in bis zu 10% der betroffenen Patienten zu einer Polyomavirus-assoziierten Nephropathie mit einem hohen Risiko des Transplantatverlustes. Bis heute ist eine effiziente Behandlung der BKPyV-assoziierten Erkrankungen nicht möglich, da es noch kein gegen das BKPyV zugelassenes Medikament auf dem Markt gibt. In etwa 24% der Nierentransplantierten mit einer BKPyV-Reaktivierung treten bei hoher viraler Replikation zudem genetische Veränderungen (Rearrangements) der nicht-kodierenden Kontrollregion (NCCR) des BKPyV-Genoms auf, die wiederum zu einer höheren Replikation des Virus führen können. BKPyV-Stämme mit wildtypischer (archetypischer) NCCR sind jedoch die übertragbaren, persistierenden und reaktivierenden Stämme. Zur Erforschung des Lebenszyklus des BKPyV in Zellkultur *in vitro* werden primäre Epithelzellen der proximalen Nierentubuli (RPTEC) als Modell verwendet, weil die Viren hauptsächlich in diesen Zellen persistieren. Bis heute wurde aber noch kein Zellkultursystem beschrieben, mit dem es möglich ist, archetypische Stämme des BKPyV in primären RPTEC effizient und mit stabiler NCCR zu kultivieren.

In dieser Arbeit und Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurde ein solches System zur Analyse des Lebenszyklus von archetypischen BKPyV-Stämmen etabliert. Es wurde in dieser Arbeit zum Vergleich des Lebenszyklus zweier archetypischer Stämme (WWM12 und WWT), eines rearrangierten Stammes (Dunlop) und eines potenziell rearrangierten Isolats (M401), sowie zur Testung neuer Medikamente herangezogen. Beim Vergleich dieser Stämme konnte eine effizientere Replikation des Dunlop sowohl auf Ebene der DNA-Replikation, als auch der viralen Genexpression nachgewiesen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass beide Stämme die Proteinexpression der Cyclin-abhängigen Kinasen CDK1 und CDK2, welche an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, in diesem System mit unterschiedlicher Effizienz induzieren. Während bei Medikamententests eine CDK1-Inhibition zu signifikanten zytotoxischen Effekten führte, konnte durch die Medikamente Bexaroten und Fenretinid aus der Familie der Retinoide eine starke Reduktion der viralen Replikation beider Stämme bei nur schwachem Einfluss auf das Zellwachstum in den effektiven Konzentrationen nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte ein

direkt antiviraler Effekt von Bexaroten mit Hilfe von Gelshift-Analysen herausgearbeitet werden. Bexaroten blockiert die Bindung des Transkriptionsfaktors AP-1 an Bindestellen der NCCR archetypischer und rearrangierter BKPyV direkt, wodurch möglicherweise ein wichtiger Mechanismus des viralen Lebenszyklus gestört wird.

2 Summary

The life cycle of archetypal and rearranged BK polyomaviruses and the effect of compounds in a novel *in vitro* replication system

Up to 90% of the world population are latently infected with the BK polyomavirus (BKPyV). Although the primary infection takes course mostly without serious symptoms, a viral reactivation in immunosuppressed patients e. g. after renal transplantation or allogenic stem cell transplantation can lead to severe and even life-threatening diseases. After renal transplantation, a polyomavirus associated nephropathy develops after BKPyV reactivation in up to 10% of the patients with a high risk of an allograft loss. Until now, there is no efficient antiviral therapy possible as there is still no approved drug for treatment of BKPyV reactivation available. In about 24% of renal transplant patients with BKPyV reactivation, genetic variations (rearrangements) in the non-coding control region (NCCR) develop as a result of a high viral replication. These rearrangements can in turn promote the viral replication. However, BKPyV strains with a wildtype (archetype) NCCR are the transmitted, persisting and reactivating strains. For investigation of the viral life cycle in cell culture *in vitro*, primary renal proximal tubule epithelial cells (RPTEC) are used as a model as the virus persists mainly in these cells. Up till now, no cell culture system is published with whom it is possible to propagate archetypal BKPyV strains in primary RPTEC with a stable NCCR.

In this dissertation and preliminary work, such a system was established for analysis of the life cycle of archetypal BKPyV strains. It was used in this dissertation for comparison of the life cycle of two archetypal strains (WWM12 and WWT), a rearranged strain (Dunlop) and a potentially rearranged isolate (M401), as well as for testing of new drugs. By this comparison, a more efficient DNA replication as well as protein expression of the Dunlop strain could be detected. It could also be shown that both strains up-regulate the protein expression of the cyclin-dependent kinases CDK1 and CDK2 with a different efficiency. They are known to be key regulators of the cell cycle. A drug-mediated CDK1 inhibition had significant cytotoxic effects whereas the drugs Bexarotene and Fenretinide from the retinoid family exerted a strong suppression on replication of both strains. Furthermore, in effective concentrations they had only mild effects on cell growth. Additionally, a direct antiviral effect of Bexaroten could be carved out by gelshift analyses. It directly inhibits binding of the transcription factor AP-1 to binding sites in the NCCR of archetypal and rearranged BKPyV which potentially disturbs an important mechanism in the BKPyV life cycle.

3 Einleitung

3.1 Polyomaviren

Die Viren der Familie *Polyomaviridae* sind unbehüllte Viren, haben ein doppelsträngiges DNA-Genom und infizierten verschiedene Arten von sowohl Wirbeltieren, als auch wirbellosen Tieren. Der Name der Gattung leitet sich aus dem Griechischen von „poly“ (dt. viele) und „oma“ (dt. Tumor) ab, da viele Vertreter der Polyomaviren aktiv an der Entstehung von Tumoren beteiligt sein können (Calvignac-Spencer et al., 2016). Aus phylogenetischer Sicht wurden die Polyomaviren früher mit den humanen Papillomviren (HPV) aufgrund von Ähnlichkeiten ihrer Lebenszyklen in der Familie *Papovaviridae* zusammengefasst und 1999 durch das Internationale Komitee für die Taxonomie von Viren (ICTV) einer jeweils eigenen Familie zugeordnet (van Regenmortel, 2000). Alle bekannten Polyomaviren können nach der Primärinfektion latent im Wirt persistieren. 2011 wurde von der Polyomavirus-Studiengruppe des ICTV eine Einteilung der *Polyomaviridae* in die Gattungen *Orthopolyomavirus*, *Wukipolyomavirus* und *Avipolyomavirus* vorgeschlagen (Johns et al., 2011). Polyomaviren der Gattungen *Orthopolyomavirus* und *Wukipolyomavirus* enthielten Säugetier-Polyomaviren, die Gattung *Avipolyomavirus* Vogel-Polyomaviren. Ausschlaggebend für diese Einteilung war neben dem Wirtsspektrum der Viren auch die Übereinstimmung der Nukleotidsequenz der Genome. Diese Einteilung wurde längerfristig vom ICTV nicht übernommen und 2016 wurde das bis heute geltende System mit der Unterteilung in die Gattungen *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-*, und *Deltapolyomavirus* veröffentlicht. Dabei werden die Polyomaviren nur nach der Sequenz des großen T-Antigens (TA_g) in die oben genannten Gattungen eingegliedert (Calvignac-Spencer et al., 2016). Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die bedeutsamsten und am besten untersuchten Polyomaviren. Diese werden im Folgenden näher beschrieben.

Tabelle 1: Nomenklatur und Klassifizierung relevanter Polyomaviren.

Polyomavirus	Synonym	Gattung	Wirt	Referenz
<i>Mus musculus</i> Polyomavirus 1	Maus- Polyomavirus	α-Polyomavirus	<i>Mus musculus</i>	Gross et al. 1953
<i>Macaca mulatta</i> Polyomavirus 1	SV40	β-Polyomavirus	<i>Macaca mulatta</i>	Sweet und Hilleman 1960
Humanes Polyomavirus 1	BK- Polyomavirus	β-Polyomavirus	<i>Homo sapiens</i>	Gardner et al. 1971
Humanes Polyomavirus 2	JC-Polyomavirus	β-Polyomavirus	<i>Homo sapiens</i>	Padgett et al. 1971
Humanes Polyomavirus 5	Merkelzell- Polyomavirus	α-Polyomavirus	<i>Homo sapiens</i>	Feng et al. 2008

Das erste Polyomavirus wurde 1953 zufällig entdeckt und anfangs als „filtrierbare Substanz“ beschrieben. In dieser Studie wurden Leber-, Milz- und Tumorextrakte von leukämischen Mäusen präpariert und gesunde, neugeborene Mäuse damit beimpft. In der Folge starben alle an diversen Tumoren, ausgelöst durch in den Extrakten enthaltenen „Substanzen“ (Gross, 1953). Dass Viren für die tumorigenen Effekte der Extrakte verantwortlich waren, wurde fünf Jahre später bewiesen (Eddy et al., 1958). Dieses Virus war zuerst als S. E. Polyomavirus (nach den Entdeckern Sarah Stewart und Bernice Eddy) bekannt und später in „murines Polyomavirus“ (MPyV) umbenannt. Ein weiterer bekannter Vertreter der Polyomaviren stellt das *Simian Vacuolating Virus 40* (SV40), auch *Macaca mulatta Polyomavirus 1* genannt, dar. Dieses Virus wurde zum ersten Mal 1960 in kontaminierten Nierenzellkulturen von Rhesusaffen und gemeinen Makaken, die in den USA zur Herstellung von Poliovakzinen verwendet wurden, nachgewiesen (Sweet und Hilleman, 1960). In den folgenden Jahren entwickelte sich das SV40 zu einem wichtigsten Forschungsobjekt, mit dessen Hilfe unter anderem der humane Tumorsuppressor p53 und Enhancer-Elemente in der DNA von Promotoren entdeckt werden konnten (Lane und Crawford, 1979; Banerji et al., 1981). Eine Relevanz des SV40 in der humanen Krebsentstehung wird immernoch kontrovers diskutiert (Poulin und DeCaprio, 2006). Das erste humanpathogene Polyomavirus, das mit der Krebsentstehung im Menschen assoziiert ist, ist das Merkelzellpolyomavirus (MCPyV). Das MCPyV wurde 2008 in Merkelzelltumoren entdeckt (Feng et al., 2008). Die genaue Rolle des MCPyV bei der Krebsentstehung ist gegenwärtig Gegenstand der Forschung. Es konnte bereits gezeigt werden, dass etwa 80% der Merkelzelltumore positiv für das MCPyV sind und das Virus dort integriert im Wirtszellgenom vorliegt. Vor allem die T-Antigen Expression des integrierten Virus wird für die Karzinogenese in Merkelzellen verantwortlich gemacht (Houben et al., 2010; DeCaprio, 2017).

Die humanpathogenen Polyomaviren mit der größten medizinischen Relevanz für den Menschen sind das BK- und das JC-Polyomavirus, die beide nach den Initialen der Patienten, aus denen sie das erste Mal isoliert wurden, benannt sind. Das BK-Polyomavirus wurde 1971 aus dem Urin eines Nierentransplantierten mit Uretherstenose isoliert und charakterisiert (Gardner et al., 1971). Das JC-Polyomavirus wurde im selben Jahr unabhängig des BKPyV aus dem Hirn eines Patienten mit progressiver multifokaler Leukoencephalopathie in Folge eines Hodgkin-Lymphoms isoliert (Padgett et al., 1971).

3.2 Das BK-Polyomavirus

3.2.1 Epidemiologie und Übertragung

Bis zu 90% der Weltbevölkerung sind latent mit dem BKPyV infiziert. Die Primärinfektion findet überwiegend im Kindesalter zwischen dem 6. und 10. Lebensjahr, statt. Sie verläuft in der Regel symptomlos, jedoch sind milde Atemwegserkrankungen in Folge der Primärinfektion möglich (Jiang et al., 2009b; Goudsmit et al., 1982). Bei der Primärinfektion wird das Virus in den Körper aufgenommen und persistiert anschließend im Harntrakt. Vor allem die Tonsillen scheinen bei der Übertragung eine große Rolle zu spielen, denn BKPyV-DNA konnte in einer Studie von Goudsmit et al. (1982) häufig in den Tonsillen von untersuchten Kindern mit respiratorischen Erkrankungen nachgewiesen werden. Für das JCPyV wurde gezeigt, dass die Infektion der Tonsillen den ersten Schritt der Übertragung darstellt und das Virus anschließend durch tonsilläre Lymphozyten über das Blut weitertransportiert wird (Monaco et al., 1998). Dieser Mechanismus ist ebenfalls für die Primärinfektion des BKPyV naheliegend, da DNA des BKPyV bereits in Lymphozyten nachgewiesen werden konnte (Azzi et al., 1996). Neben einer horizontalen Übertragung wurde auch eine vertikale Übertragung von der Mutter auf ihr Kind beschrieben, die von Boldorini et al. (2011) in 21% der untersuchten Neugeborenen nachgewiesen werden konnte. Als Ort der viralen Replikation und Persistenz sind für das BKPyV hauptsächlich Epithelzellen der proximalen Nierentubuli, sowie das Blasenepithel beschrieben (Chesters et al., 1983; Doerries, 2006; Imperiale und Jiang, 2016).

3.2.2 Genomaufbau

Das Genom des BKPyV besteht wie das Genom aller Polyomaviren aus einem ringförmig geschlossenen doppelsträngigen DNA-Molekül mit einer Größe zwischen 5,1 und 5,2 kbp (Seif et al., 1979; Eash et al., 2006). Im Virion liegt es assoziiert mit den humanen Wirtszellhistonen H2a, H2b, H3 und H4 mehrfach gewunden (*supercoiled*) in einer chromosomartigen Struktur vor (Flaegstad et al., 1988; Meneguzzi et al., 1978). Das Genom kann, wie in Abbildung 1 gezeigt ist, in drei große Regionen unterteilt werden. In der frühen Region (*early coding region*) liegen die früh exprimierten Gene, das große (TAg), das kleine (tAg) T-Antigen, sowie das truncierte T-Antigen (truncTAg). Diese werden nach der Entpackung des Genoms in der Wirtszelle als erstes exprimiert und initiieren unter anderem die Replikation der viralen DNA und die Expression der späten viralen Gene. Die späte Genregion (*late coding region*) kodiert für die späten Proteine VP1, VP2 und VP3, sowie das Agnoprotein, die vor allem am Aufbau des viralen Kapsids, der Verpackung der viralen DNA und der Assemblierung der Nachkommen-Virionen beteiligt sind (Seif et al., 1979; Rinaldo et al., 2013).

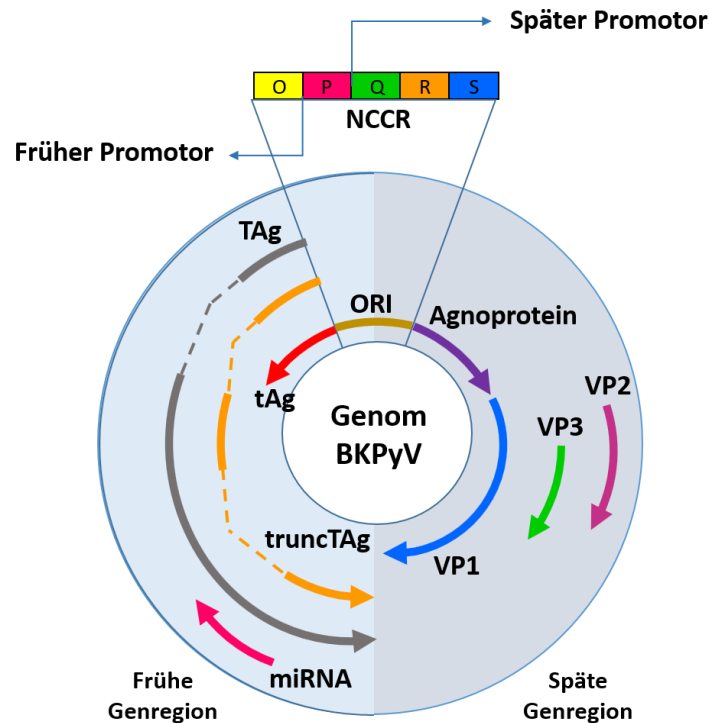


Abbildung 1: Genomaufbau des BKPyV.

Das Genom des BKPyV wird in die frühe Region mit den Genen für die T-Antigene, die späte Region mit den Genen für die VP-Proteine und das Agnoprotein, sowie die nicht-kodierende Kontrollregion (NCCR) unterteilt. Zusätzlich liegt in der frühen Region eine miRNA kodiert, die über den Promotor der späten Region abgelesen wird. Eigene Abbildung nach Ambalathingal et al. (2017) und Levican et al. (2018).

Zwischen der frühen und späten Genregion liegt die nicht-kodierende Kontrollregion (NCCR), in der sowohl der Replikationsursprung (*origin of replication*, ORI) und die Promotoren beider Genregionen, als auch Enhancer-Regionen und Bindestellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren liegen (Rinaldo et al., 2013). Eine Besonderheit bildet die im Genom kodierte miRNA. Die Expression der miRNA wird vom Promoter der späten Genregion reguliert, ihre Sequenz liegt aber auf der Seite der frühen Gene. Die transkribierte miRNA ist dadurch komplementär zur mRNA des N-Terminus des TAg (Seo et al., 2008).

3.2.3 Nicht-kodierende Kontrollregion (NCCR)

3.2.3.1 Funktion und Rearrangements

Die NCCR bildet mit in der Regel weniger als 400 bp die kleinste Region im Genom des BKPyV, erfüllt jedoch essenzielle Funktionen im viralen Lebenszyklus. Da es sich beim Genom des BKPyV um ein ringförmiges DNA-Molekül mit nur einer Kontrollregion handelt, liegt in ihr sowohl der Promotor der frühen, als auch der der späten Gene. Die Genexpression verläuft von der NCCR ausgehend bidirektional. Die ersten Untersuchungen zur Struktur und Funktion der NCCR wurden 1987 von Rubinstein et al. veröffentlicht. Dabei wurden verschiedene BKPyV-Isolate kloniert und

die NCCR-Sequenzen miteinander verglichen. In dieser Studie wurden zum ersten Mal strukturelle Unterschiede in der NCCR verschiedener Isolate nachgewiesen. Diese Unterschiede beschränkten sich nicht auf einzelne Basenaustausche, sondern auch Insertionen und Deletionen ganzer Blöcke konnten nachgewiesen werden. Aufgrund der genetischen Variabilität der NCCR wird diese heute als Unterscheidungsmerkmal verschiedener Stämme verwendet (Rubinstein et al., 1987). Prinzipiell unterschieden werden wildtypische, also unveränderte Stämme (Archetypen), und rearrangierte Stämme mit einer abweichenden NCCR-Struktur (Sugimoto et al., 1990). Die heute gebräuchliche Gliederung der NCCR in verschiedene funktionelle Blöcke wurde 1995 von Moens et al. definiert. Abbildung 2 zeigt eine schematische Übersicht über die archetypische NCCR (WW; Genbanknummer M15987.1; Rubinstein et al., 1987) und die NCCR des Dunlop-Stamms (Genbanknummer NC_001538; Seif et al., 1979) im Vergleich mit der NCCR des ersten von Gardner et al. (1971) isolierten Stammes (Genbanknummer LC029411.1).

Die archetypische NCCR besteht aus dem O-Block mit 142 bp, dem P-Block mit 68 bp, dem Q-Block mit 39 bp, dem R-Block mit 63 bp und dem S-Block mit 63 bp. Beim rearrangierten Dunlop-Stamm sind die Blöcke Q und R komplett deletiert, der P-Block liegt fast verdreifacht vor. Der Gardner-Stamm besitzt einen fast verdoppelten Q- und P-Block, vom R-Block sind an zwei Stellen insgesamt nur 24 bp erhalten geblieben.

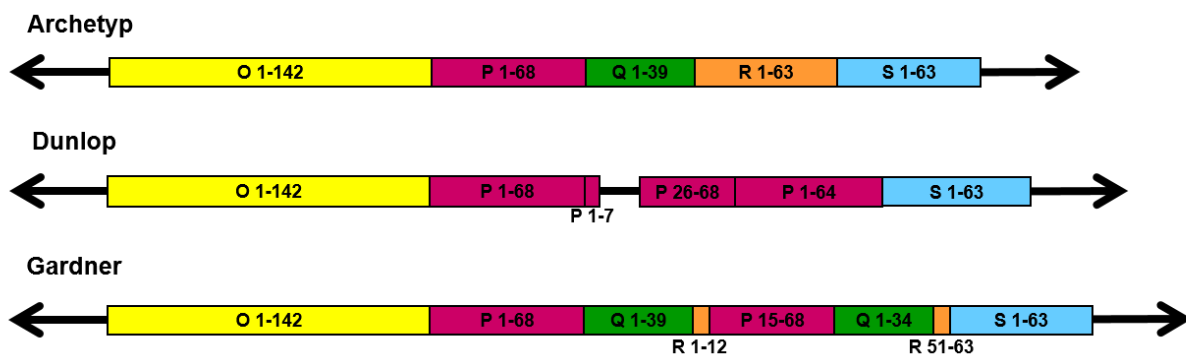


Abbildung 2: NCCR-Struktur verschiedener BKPyV Stämme.

Die archetypische NCCR besteht aus den Blöcken O, P, Q, R und S. In dem rearrangierten Dunlop-Stamm sind die Blöcke Q und R vollständig deletiert und der P-Block liegt fast verdreifacht vor. Bei dem Gardner-Stamm liegt eine teilweise Deletion des R-Blocks vor und Teile des P- und Q-Blocks sind verdoppelt. Eigene Abbildung nach der Gliederung von Moens et al. (1995).

Ein genauer Mechanismus der Entstehung der Rearrangements wurde bislang nicht nachgewiesen. Als potenzieller Mechanismus wurde eine nicht-homologe Rekombination zweier DNA-Fragmente bei der DNA-Replikation postuliert (Rinaldo et al., 2013). Allgemein wird davon ausgegangen, dass eine Vielzahl an Rearrangements der NCCR zufällig bei der DNA-Replikation entsteht und einzelne Varianten mit einer effektiveren Replikation im Wirt mit der Zeit evolutionär selektioniert werden (Gosert et al., 2008). Ausschlaggebend für die Replikationseffizienz

verschiedener rearrangierter Stämme sind die in der NCCR enthaltenen Bindestellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren (siehe Abschnitte 3.2.3.2 und 3.2.3.3). Da sich diese Bindestellen durch die Rearrangements verändern, kann von einer gerichteten Evolution des Virus zur Anpassung an die Bedingungen im Wirt ausgegangen werden (Gosert et al., 2008). Als ausschlaggebend für die höhere Replikationsrate der rearrangierten Stämme wird eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen früher und später Genexpression angesehen. Durch die Veränderung der Bindestellen in der NCCR rearrangierter Stämme scheint die Aktivität des frühen Promotors zu steigen, wodurch die frühe Genexpression verstärkt wird. Diese höhere Expression der frühen Gene dient dabei als Grundlage für eine effizientere Replikation des Virus (Bethge et al., 2015).

Die Tatsache, dass ausschließlich archetypische BKPyV Stämme regelmäßig von gesunden Patienten über den Urin ausgeschieden werden legt nahe, dass nur die archetypischen Stämme von Mensch zu Mensch übertragen werden und in der Wirtszelle persistieren. Rearrangements scheinen ausschließlich *de novo* bei hoher viraler Replikation nach der Reaktivierung im Patienten zu entstehen (Gosert et al., 2008; Rinaldo et al., 2013).

3.2.3.2 Die NCCR und der Transkriptionsfaktor AP-1

Der Transkriptionsfaktor AP-1 setzt sich aus Dimeren von Proteinen der Jun-, Fos-, ATF-, Maf- und JDP-Familie zusammen. Charakteristisch für diese Proteinfamilien ist, dass sie alle eine Leucin-Zipper-Domäne besitzen, durch die ihre Dimerisierung und ihre Funktion als Transkriptionsfaktor gewährleistet wird. Die wichtigsten und am besten untersuchten Untereinheiten von AP-1 sind die Jun- (c-Jun, JunB, JunD) und Fos- (c-Fos, FosB, Fra1, Fra2) Familien (Shaulian, 2010). Die Bindung von AP-1 an die DNA erfolgt an speziellen Sequenzmotiven, die auch *TPA-response elements* (TRE) genannt werden (Hess et al., 2004). Diese Bezeichnung kommt von der ersten Beschreibung der DNA-Bindemotive von AP-1 als TPA-induzierbare DNA-Sequenzen (Angel und Karin, 1991). Bei TPA (Tetradecanoylphorbol-acetat, abgekürzt auch als PMA) handelt es sich um eine Substanz der Gruppe der Phorbolster, die in der Lage ist, die Aktivität von AP-1 durch Stimulation des Proteinkinase C Signalweges zu erhöhen (Angel et al., 1987; Angel et al., 2001).

Je nach Zusammensetzung der Dimere kann die Expression einer Vielzahl von Genen durch AP-1 reguliert werden. Eine weitere wichtige Funktion von AP-1 ist die Regulation der Zellproliferation und -differenzierung. Dabei ist seine Rolle als Onkogen oder Tumorsuppressor nicht eindeutig definierbar und hängt stark von den beteiligten Untereinheiten ab. Von c-Jun ist bekannt, dass es beispielsweise in Sarkomen überexprimiert ist und die Zellproliferation begünstigt bzw. Apoptose verhindert (Mariani et al., 2007; Shaulian, 2010). Bei genaueren Untersuchungen konnte gezeigt

werden, dass c-Jun p53 herunterregulieren kann, was zur Aktivierung verschiedener CDK und Cycline führt und folglich die Zellproliferation anregt (Schreiber et al., 1999). Ein gegenteiliger Mechanismus ist unter anderem von JunB bekannt. In Maus-Fibroblasten konnte beobachtet werden, dass es die Expression von p16 aktiviert, wodurch die Proliferation der Zellen negativ reguliert wird (Passegue und Wagner, 2000; Shaulian 2010). Daneben konnte auch eine Suppression der Cyclin D1 Promotoraktivität durch JunB nachgewiesen werden (Bakiri et al., 2000; Shaulian, 2010).

Bereits 1988 konnten von Markowitz und Dynan mittels *DNase I footprint assays* PMA-induzierbare Bindestellen in der NCCR nachgewiesen werden. Verwendet für diesen Nachweis wurden Proteinextrakte, die mit Hilfe einer Konsensussequenz für AP-1 aufgereinigt wurden. Für die Bindung an diese DNA-Motive wurde entsprechend AP-1 als verantwortlicher Faktor postuliert, aber die Identität des bindenden Proteins wurde nicht zweifelsfrei gezeigt (Markowitz und Dynan, 1988). Nachgewiesen werden konnte eine PMA-induzierte Bindung in dieser Studie darüber hinaus nur an die NCCR des Dunlop-Stamms. In der archetypischen NCCR wurden keine PMA-induzierbaren Bindestellen gefunden. Mit Hilfe von *DNase I footprint assays* und *Linker Scan* Analysen mit verkürzten Promotorregionen wurde in weiteren Studien eine Relevanz der potenziellen AP-1 Bindestellen für die Genexpression des BKPyV untersucht (Deyerle und Subramani, 1988; Cassill et al., 1989). Von Deyerle und Subramani konnte eine Proteinbindung an den frühen Promotor der NCCR an einer AP-1 Konsensussequenz nachgewiesen werden. Die Rolle dieser Proteinbindung für die frühe Genexpression wurde in dieser Studie nicht näher untersucht. Eine Deletion potenzieller AP-1 Bindestellen im späten Promotor führte in der Studie von Cassill et al. zu einer verringerten Aktivität dieses Promotors. Von Moens et al. (1990) wurde zudem gezeigt, dass eine Stimulation von Gardner-infizierten BHK-21 mit PMA die Expression der frühen Genregion des BKPyV erhöht. Als Mechanismus wurde in dieser Studie eine Induktion der AP-1 Bindeaktivität an die NCCR an PMA-induzierbare Elemente der NCCR postuliert. Wie auch in den vorher beschriebenen Studien wurde die AP-1 Bindung an die NCCR experimentell nicht verifiziert. Auf Grundlage dieser Studien ist eine wichtige Funktion von AP-1 im viralen Replikationszyklus naheliegend, aber die direkte Interaktion von AP-1 mit der NCCR ist noch nicht abschließend belegt.

Eine Übersicht über Bindestellen für AP-1 in der NCCR des WWM12-Stamms, die in den oben genannten Studien postuliert wurden, ist in Abbildung 3 dargestellt. Ebenfalls sind in dieser Abbildung Bindestellen weiterer zellulärer Transkriptionsfaktoren gezeigt, die im nächsten Abschnitt näher erläutert werden. Dabei handelt es sich zum einen um bereits beschriebene

experimentell bestätigte oder vorhergesagte Bindestellen (grün). Zum andern wurden die Bindestellen bei eigenen Analysen von PROMO vorhergesagt (orange).

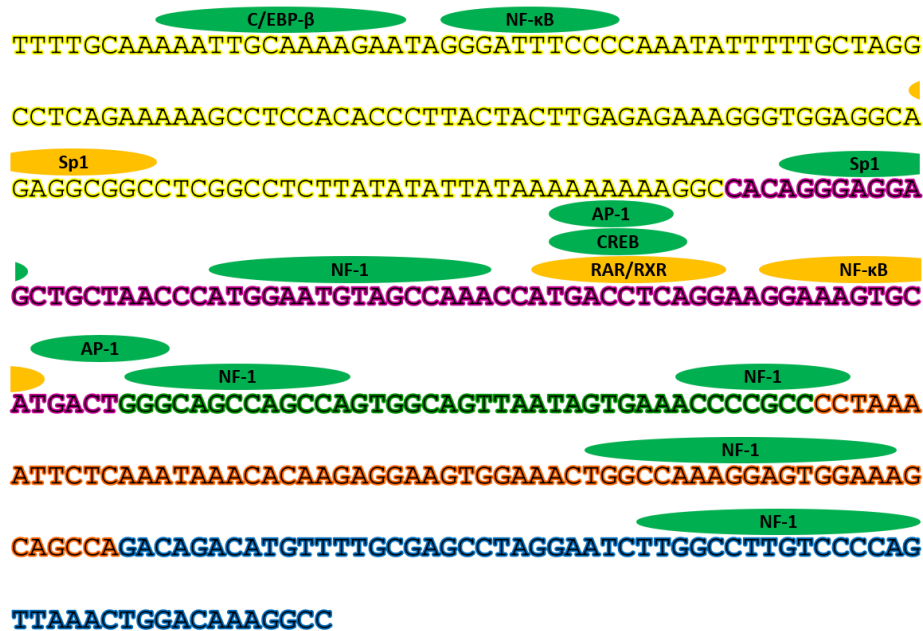


Abbildung 3: Übersicht über Bindestellen zellulärer Transkriptionsfaktoren in der NCCR des WWM12-Stamms. Bereits beschriebene Bindestellen sind grün markiert. Diese Bindestellen wurden in den Veröffentlichungen von Markowitz und Dynan (1988), Deyerle und Subramani (1988), Cassil et al. (1989), Moens et al. (1990) und Gorrill und Khalili (2005) entweder als Bindestelle vorhergesagt oder experimentell nachgewiesen (siehe Abschnitte 3.2.3.2 und 3.2.3.3). Orange markierte Bindestellen für NF-κB, Sp1, sowie RAR und RXR wurden zusätzlich in eigenen Analysen mit Hilfe des Programms PROMO vorhergesagt.

3.2.3.3 Weitere zelluläre Transkriptionsfaktoren

Von Nowock et al. (1985) konnte zum ersten Mal die Bindung von Proteinen der NF-1 Familie an die NCCR nachgewiesen werden. In der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Studie von Markowitz und Dynan (1988) konnte diese Bindung bestätigt werden und Bindestellen für Sp1 konnten ebenfalls identifiziert werden. Im Vergleich zu AP-1 konnten diese Bindestellen ebenfalls in der archetypischen NCCR nachgewiesen werden. Über die Funktion der Bindung von NF-1 an die NCCR gibt es unterschiedliche Berichte. Von Grinnell et al. (1988) wurde beschrieben, dass die NF-1-Bindung an die NCCR einen negativen Einfluss auf die Enhancerregion hat. Von Cassill et al. (1989) hatte eine Deletion einzelner NF-1 Bindestellen in CV-1 Zellen nur einen geringen Effekt auf die Promotoraktivität. Als Grund dafür wurde eine mögliche Redundanz der unterschiedlichen NF-1-Bindestellen angegeben. In dieser Studie wurde ebenfalls postuliert, dass die Wirkung von NF-1 auf die virale Genexpression abhängig von einer Sp1-Bindestelle in direkter Nachbarschaft sein könnte, wodurch NF-1 trotz dieser Ergebnisse einen wichtigen Einfluss auf die virale Replikation haben könnte. Ein positiver Einfluss von NF-1 auf die Replikation des BKPyV wurde 2012 von Liang et al. durch Mutation der NF-1 Bindestellen nachgewiesen. Eine Bedeutung

von Sp1-Bindestellen der NCCR für die bidirektionale Transkription der viralen Gene beider Genregionen wurde 2015 von Bethge et al. mittels Mutationen der NCCR verschiedener Stämme und Expressionsanalysen der viralen Genregionen nachgewiesen (Bethge et al., 2015).

Weitere für die Genexpression des BKPyV relevante Transkriptionsfaktoren sind p65 aus dem NF- κ B-Komplex, sowie C/EBP- β . Für Dunlop konnte eine synergistische Aktivierung des frühen Promotors durch NF- κ B und C/EBP- β gezeigt werden, die aus der direkten Nachbarschaft der jeweiligen Bindestellen und einer möglichen Protein-Protein-Interaktion beider Transkriptionsfaktoren resultiert (Gorrill und Khalili, 2005). Ein Stamm-abhängiger Effekt auf die virale Replikation konnte für TGF- β gezeigt werden (Abend und Imperiale, 2008). Für die NCCR des TU-Stamms, konnte in dieser Studie eine Induktion des frühen Promotors durch TGF- β nachgewiesen werden. Bei anderen Stämmen konnte diese Induktion nicht beobachtet werden. In der Studie von Moens et al. (1990) wurde neben dem Effekt von PMA auf die Genexpression des BKPyV auch cAMP zur Stimulation verwendet. Dabei konnte ebenfalls eine Aktivierung der frühen Genexpression nachgewiesen werden. Als Mechanismus wurde die Aktivierung eines *cAMP response element* (CRE) der NCCR durch CREB postuliert.

3.2.4 Virale Proteine und Kapsidaufbau

3.2.4.1 Frühe Proteine

Die Proteine des BKPyV, die nach dem Eintritt in die Wirtszelle und nach dem Entpacken des Genoms exprimiert werden, sind zwei T-Antigene. Beide Proteine entstehen aus dem gleichen Transkript, wobei das TAg das Volllängenprotein darstellt. Das tAg ist eine verkürzte Variante des TAg, die durch alternatives Spleißen entsteht. Mit einer Größe von 172 Aminosäuren ist das tAg nur etwa ein Viertel so groß wie das TAg (695 Aminosäuren). Bedingt durch die Homologie der Aminosäuresequenz beider Proteine am N-Terminus können sie in der Wirtszelle teilweise redundante Funktionen ausüben (Topalis et al., 2013). Die vielfältigen Funktionen des TAg ergeben sich aus den verschiedenen in Abbildung 4 gezeigten Domänen des Proteins. Viele dieser Funktionen wurden bisher nur für das TAg des SV40 beschrieben. Aufgrund der hohen Homologie des TAg des SV40 und dem des BKPyV ist davon auszugehen, dass die Funktionen beider Proteine sehr ähnlich sind (Yang und Wu, 1979).

Von der J-Domäne des TAg ist bekannt, dass sie ein Bindemotiv für das *Heat shock protein 70* (Hsp70), welches als Chaperon an der Proteinfaltung beteiligt ist, enthält. Für das TAg des SV40 ist beschrieben, dass eine Rekrutierung des Hsp70 zu einer Zerstörung der 107-E2F und p130-E2F Komplexe in der Zelle führen kann. Die Proteine p107 und p130 gehören zur Retinoblastoma-Familie (Rb-Familie) und sind als Tumorsuppressoren negative Regulatoren des Zellzyklus

(Zellzyklus und Zellzyklusregulation siehe Abschnitt 3.3). Durch die Auflösung dieser Komplexe wird E2F freigesetzt und kann als Transkriptionsfaktor die Expression positiver Zellzyklusregulatoren und dadurch den Zellzyklus aktivieren. Durch diesen Mechanismus kann die Replikation der viralen DNA gewährleistet werden (Topalis et al., 2013; Sullivan et al., 2004). Daneben besitzt das TAg auch eine direkte pRb-Bindedomäne, mit einer ähnlichen Funktion (Harris et al., 1996; Topalis et al., 2013).

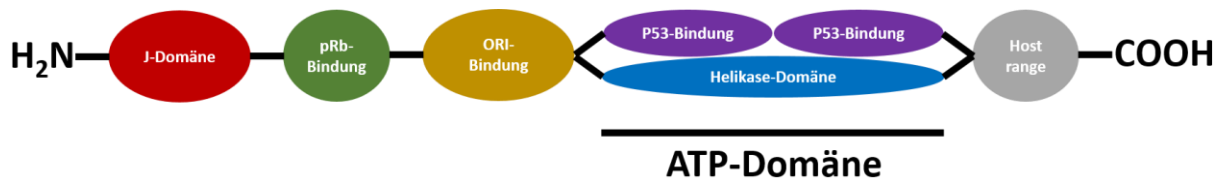


Abbildung 4: Domänen des großen T-Antigens.

Am N-Terminus des TAg liegt die J-Domäne mit einem Bindemotiv für *das Heat shock protein 70*. Daran anschließend liegt die pRb-Bindedomäne zur Interaktion mit pRb und die ORI-Bindedomäne mit der das TAg mit der viralen DNA interagieren kann. In der ATP-Domäne liegen zum einen Bindemotive für p53, zum anderen eine Helikase-Domäne. Am C-Terminus des TAg liegt die *Host range* Domäne. Eigene Abbildung nach Vorlage von Topalis et al. (2013).

Eine weitere Domäne des TAg, die für den viralen Lebenszyklus essenziell ist, ist die ORI-Bindedomäne (OBD). Mit dieser Domäne kann das TAg an den ORI der NCCR des eigenen Genoms binden. Diese Bindung wird für die Funktion des TAg als Helikase benötigt, die zur Entwindung der viralen DNA führt. Da das BKPyV keine eigene DNA-Polymerase besitzt, stellt diese Funktion des TAg eine wichtige Voraussetzung für die DNA-Replikation dar (Wessel et al., 1992; Valle et al., 2000). Da dieser Prozess ATP-abhängig ist, besitzt das TAg ebenfalls eine ATP-Bindedomäne (Borowiec und Hurwitz, 1988; Topalis et al., 2013). Neben der Bindung und Inaktivierung der pRb-Tumorsuppressoren besitzt das TAg zusätzlich eine p53-Bindedomäne, durch deren Binding an p53 die Funktionen des Proteins, wie z. B. die Aktivierung der Expression von weiteren Tumorsuppressoren wie p21 inhibiert werden kann (Bollag et al., 1989; Jiang et al., 1993; Topalis et al., 2013). Damit vereint das TAg trotz unterschiedlicher Mechanismen grundlegende Funktionen der Onkoproteine E6 und E7 der humanen Papillomviren (Lechner et al., 1992; Chellappan et al., 1992).

Eine besondere Funktion des tAg ist die Interaktion mit der Proteinphosphatase 2A (PP2A). Durch diese Interaktion wird die Aktivität der PP2A inhibiert, was in der Folge zur Aktivierung des MAPK- und AP-1 Signalwegs führt. Daraus resultiert letztlich eine erhöhte Expression von Cyclin A und D1. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass das Tumorsuppressorprotein p27 durch tAg- und PP2A-abhängige Signalwege inhibiert werden kann (Yang et al., 1991; Skoczylas et al., 2004; Bennett et al., 2012).

Neben dem großen und kleinen T-Antigen konnte auch eine dritte, mit einer Größe von 136 Aminosäuren, verkürzte (trunkierte) Form des T-Antigens nachgewiesen werden. Dieses truncTAg kann ebenfalls durch alternatives Spleißen aus der Vorläufer-mRNA des TAg entstehen. Für dieses Protein sind keine unikalen Funktionen bekannt. Da das truncTAg identisch mit dem N-Terminus des TAg ist und die J-Domäne, sowie die Rb-Bindedomäne im truncTAg konserviert sind, geht man davon aus, dass das truncTAg die entsprechenden Funktionen dieser Domänen ausüben kann (Abend et al., 2009). Es könnte folglich eine Rolle beim Eingriff in den Zellzyklus bzw. der Wirtszelltransformation spielen. Ähnliche Funktionen sind für trunkierte TAg anderer Polyomaviren (z. B. für das SV40) bereits beschrieben (Zerrahn et al., 1993).

3.2.4.2 Späte Proteine

Nach der Expression der frühen Gene und der DNA-Replikation des Virusgenoms werden die späten Gene des BKPyV exprimiert. Diese kodieren für die Kapsidproteine VP1, VP2, VP3, sowie das Agnoprotein. Während VP1 und das Agnoprotein über ein eigenes Transkript exprimiert werden, werden VP2 und VP3 über eine bicistronische mRNA mit zwei offenen Leserahmen exprimiert. Daraus resultiert eine hohe Identität der Proteinsequenzen des VP2 und VP3. Das VP2 besitzt einen im Vergleich zum VP3 verlängerten N-Terminus (Rinaldo et al., 2013). Während die ausschließliche Funktion der VP-Proteine in der Kapsidbildung besteht, ist das Agnoprotein als einziges spätes Protein nicht in Virionen nachweisbar (Jackson und Chalkley, 1981). Für SV40 konnte gezeigt werden, dass das Agnoprotein hauptsächlich perinukleär im Zytoplasma lokalisiert ist (Nomura et al., 1983). Ebenfalls wurde für SV40 beschrieben, dass das Agnoprotein bei der zellulären Lokalisation des VP1 eine Rolle zu spielen scheint. In dieser Studie wurde postuliert, dass es die Re-Lokalisation des VP1 nach der Translation zurück in den Nukleus befördert, wodurch die Assemblierung des Kapsids gerichtet ablaufen kann (Resnick und Shenk, 1986).

Die Expression des Agnoproteins des BKPyV konnte 1998 das erste Mal gezeigt werden. Dabei wurde die Hypothese aufgestellt, dass seine Hauptfunktion nicht in der Re-Lokalisation des VP1 besteht. Seine Lokalisation in der perinukleären Region sei bedingt durch seine Funktion als *Shuttle*-Protein für fertig zusammengebaute Virionen aus der Zelle mittels vesikulären Transports (Rinaldo et al., 1998; Clayson et al., 1989). Diese Theorie konnte 2018 gestützt werden. In dieser Studie wurde das Agnogen des BKPyV mutiert, wodurch die betroffenen Viren Defekte im Transport der Nachkommen-Virionen aus der Zelle zeigten (Panou et al., 2018). Eine weitere Studie zur Funktion des Agnoproteins legt eine Rolle bei der Persistenz des Virus nahe. Es konnte eine inhibitorische Funktion des Agnoproteins auf das *Proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) durch direkte Protein-Protein-Interaktion gezeigt werden, wodurch die DNA-Replikation der

Wirtszelle inhibiert wurde. Dieser Effekt könnte eine wichtige Rolle beim Übergang von der produktiven Phase in die latente Phase des BKPyV-Lebenszyklus spielen (Gerits et al., 2015).

3.2.4.3 Kapsidaufbau

Das ikosaedral aufgebaute Kapsid des BKPyV hat einen Durchmesser von etwa 50 nm und ist zusammengesetzt aus 72 Untereinheiten, die als Kapsomere bezeichnet werden. Jedes Kapsomer besteht wiederum aus einem VP1-Pentamer (Baker et al., 1989; Nilsson et al., 2005). Für VP2 und VP3 konnte gezeigt werden, dass sie mit den VP1-Pentameren assoziiert in den Virionen vorliegen und bei dessen Assemblierung eine Rolle spielen (Griffith et al., 1992). Die genaue Lokalisation von VP2/3 im Virion wurde von Hurdiss et al. (2016) mittels hochauflösender Elektronenmikroskopie von Virus-artigen Partikeln (VLP) untersucht (siehe Abbildung 5). Dabei konnte ein VP2- oder VP3-Protein pro Kapsomer an dessen Innenseite nachgewiesen werden. Diese Interaktion von VP2/3 mit den VP1-Pentameren scheint zum einen deren Stabilität zu verbessern, zum anderen wurde aufgrund der Lage von VP2/3 an der Innenseite des Virions eine Interaktion von VP2/3 mit den Histonen des verpackten Genoms angenommen (Hurdiss et al., 2016). Dadurch könnte die Bindung des viralen Genoms innerhalb des Virions gewährleistet werden, was bei der Verpackung eine Rolle spielen könnte.

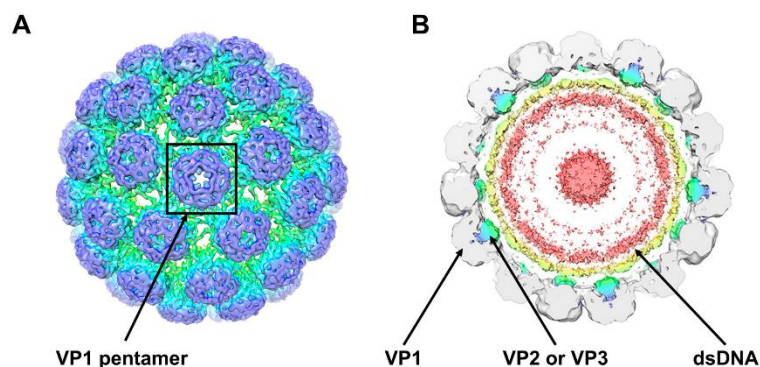


Abbildung 5: Kapsidaufbau des BKPyV.

(A) Schematischer Aufbau des Kapsids des BKPyV mit der Unterteilung in 72 VP-1 Pentamere (Kapsomere). (B) Querschnitt durch das Kapsid des BKPyV mit sichtbarer Lokalisation von VP2/3 (blau) an der Innenseite der Kapsomere und der Lage des viralen Genoms (gelb/rot). Abbildung von Helle et al. (2017).

Durch Polymorphismen im VP1-Gen können beim BKPyV verschiedene Serotypen unterschieden werden, die neben der NCCR ebenfalls zur Typisierung unterschiedlicher BKPyV-Stämme herangezogen werden können. Entscheidend ist dabei, dass die VP1-Epitope auf der Oberfläche des Kapsids bei verschiedenen Serotypen auch zu unterschiedlichen Eintrittsmechanismen und Interaktionen mit dem menschlichen Immunsystem führen können (Luo et al., 2012; Pastrana et al., 2013). Allgemein unterschieden werden die Serotypen I, II, III und IV. Die Serotypen I und IV werden wiederum in Subtypen mit unterschiedlicher geographischer Verteilung untergliedert. Mit

einer Prävalenz von 46-82% ist Serotyp I weltweit am weitesten verbreitet. Der in Europa am weitesten verbreitete Subtyp ist Ib-2 (77,5% von Serotyp I). Am zweithäufigsten konnte der Serotyp IV mit einer Prävalenz von 12-54% nachgewiesen werden, mit Subtyp IV-c2 als vorherrschendem Subtyp in Europa. Die Serotypen II und III sind im Vergleich dazu nur selten nachweisbar (Luo et al., 2008; Luo et al., 2012).

3.2.5 Virale miRNA

Die Polyomaviren zählen zu den DNA-Viren, die in der Lage sind, eine eigene miRNA zu exprimieren (Gottwein und Cullen, 2008). Wie bereits in Abschnitt 3.2.2 beschrieben wurde, wird die Expression der miRNA des BKPyV vom Promotor der späten Gene reguliert und ist in der frühen Genregion liegend komplementär zum 3'-Ende des Transkripts des TAg. Daraus resultiert, dass die Genexpression des TAg bei einer hohen Aktivität des späten Promotors durch eine erhöhte Expression der miRNA inhibiert werden kann. Dieser Mechanismus könnte im viralen Lebenszyklus der Umschaltung von früher zu später Genexpression, sowie zur Persistenz dienen (Seo et al., 2008; Broekema und Imperiale, 2013; Tian et al., 2014). Wie in Abschnitt 3.2.3.1 beschrieben wurde, zeichnen sich archetypische Stämme durch eine im Vergleich zu rearrangierten Stämmen schwachen Aktivität des frühen und einer starken Aktivität des späten Promotors aus (Bethge et al., 2015; Imperiale und Jiang, 2016). Die dadurch bedingte erhöhte Expression der viralen miRNA und Unterdrückung der Replikation könnte auch der Grund dafür sein, dass archetypische Stämme die persistierenden Stämme des BKPyV darstellen.

Desweiteren wurde eine Funktion der miRNA bei der Immunevasion des BKPyV beschrieben. Von Bauman et al. (2011) wurde gezeigt, dass der stress-induzierte Ligand ULBP3 ein Ziel der miRNA des BKPyV sein kann. Bei ULBP3 handelt es sich um ein Protein, das auf der Zelloberfläche exprimiert als Ligand für den NKG2D-Rezeptor von natürlichen Killerzellen dienen kann, was ein Abtöten der ULBP3-exprimierenden Zelle zur Folge hat. Durch die Herunterregulation von ULBP3 könnte dieser Mechanismus vom BKPyV inhibiert werden (Bauman et al., 2011). Ähnliche Mechanismen wurden mehrfach für Herpesviren nachgewiesen (Stern-Ginossar et al., 2007).

3.2.6 Replikationszyklus

Für den Eintritt des BKPyV in die Wirtszelle konnte gezeigt werden, dass die $\alpha(2,3)$ -, sowie $\alpha(2,8)$ -Sialysäurereste der Ganglioside GD1b und GT1b an der Zelloberfläche als Rezeptoren für die Virionen genutzt werden können (Dugan et al., 2005; Low et al., 2006). Von Gangliosiden ist bekannt, dass sie häufig mit Caveolae assoziiert sind, wodurch auch ein Caveolae-abhängiger vesikulärer Transport der BKPyV Virionen in die Wirtszelle nachgewiesen werden konnte

(Chigorno et al., 2000; Wolf et al., 1998; Dugan et al., 2005; Moriyama et al., 2007). In einer Studie von Eash und Atwood konnte zudem gezeigt werden, dass die Caveolae-abhängige Internalisation der Virionen relativ langsam abläuft. Es wurde belegt, dass die meisten Virionen erst 2 bis 4 Stunden nach der Infektion soweit internalisiert sind, dass sie vor neutralisierenden Antikörpern geschützt sind (Eash und Atwood, 2005).

In der Zelle werden die Vesikel anschließend entlang von Mikrotubuli ins Endoplasmatische Retikulum (ER) der Zelle transportiert (Moriyama und Sorokin, 2008; Eash und Atwood, 2005; Dugan et al., 2005). Vom ER aus wurde ebenfalls ein vesikulärer Transport, sowie eine Aggregation der Virionen in der perinukleären Region beobachtet (Drachenberg et al., 2003). Der anschließende Transport der Virionen durch den *Nuclear pore complex* (NPC) in den Nukleus ist abhängig von Kernlokalisierungssignalen (NLS) der Kapsidproteine VP2 und VP3 und wird von Importin β 1 vermittelt (Bennett et al., 2012). Es wird vermutet, dass die Entpackung der viralen DNA bereits im ER beginnt und keine vollständigen Virionen in den Nukleus transportiert werden. Dafür spricht die Exposition der NLS von VP2/3, die in einem intakten Kapsid aufgrund ihrer Lage nicht möglich wäre. Auch die bereits in Abschnitt 3.2.4.3 beschriebene Assoziation von VP2/3 mit den Histonen der viralen DNA legt nahe, dass nur VP2/3-Histon/DNA-Komplexe in den Nukleus gelangen (Maru et al., 2017; Jiang et al., 2009a; Hurdiss et al., 2016).

Der Zellaustritt der Nachkommen-Virionen kann prinzipiell auf zwei Arten erfolgen: Entweder durch vesikulären Transport der Virionen aus der Zelle oder durch Lyse der Zelle. Von Drachenberg et al. wurde 2003 mittels Elektronenmikroskopie eine Ausdehnung der Zytoplasma- und Kernmembran, also ein „Anschwellen“ des Nukleus durch die hohe Anzahl an Virionen, beobachtet. Diesem Zustand folgte ein Zerreißen der Membranen was ultimativ zur Lyse der Wirtszelle führte (Drachenberg et al., 2003). Ebenfalls konnte für das BKPyV eine nicht-lytische Freisetzung der Virionen in Abhängigkeit der Anionen-Homöostase in der Zelle nachgewiesen werden. In dieser Studie konnte dieser Mechanismus mit Hilfe eines Chloridkanal-Inhibitors blockiert werden (Evans et al., 2015).

3.2.7 Persistenz

Die genauen Mechanismen der Persistenz des BKPyV sind noch nicht abschließend geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass für eine Latenz und Reaktivierung des BKPyV ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren und Mechanismen verantwortlich ist. Zum einen ist die miRNA des BKPyV, wie es bereits in Abschnitt 3.2.5 beschrieben wurde, in der Lage, die Expression des TAGs negativ zu regulieren, was die virale Replikation inhibieren und einen latenten Zustand einleiten kann (Broekema und Imperiale, 2013). Da das virale Genom mit Histonen der Wirtszelle

assoziiert ist, wurde zum andern auch eine epigenetische Regulation der viralen Genexpression als möglicher Mechanismus postuliert. Für das JCPyV wurde die Relevanz einer epigenetischen Regulation für den viralen Lebenszyklus bereits belegt (Imperiale und Jiang, 2016; Wollebo et al., 2015).

Das menschliche Immunsystem spielt bei der viralen Persistenz eine Doppelrolle. Zum einen muss das Virus versuchen antivirale Mechanismen des Immunsystems zu unterdrücken, zum andern könnten Mechanismen des Immunsystems gezielt für einen latenten Zustand des Virus genutzt werden. Beispiele für die erstgenannte Rolle sind unter anderem die bereits beschriebene Funktion der viralen miRNA zur Unterdrückung der NK-Zell-Immunantwort, sowie die Fähigkeit der T-Antigene des BKPyV und des MCPyV die Expression des Toll-like Rezeptors TLR9 zu unterdrücken (Bauman et al., 2011; Shahzad et al., 2013; Imperiale und Jiang, 2016).

Ein möglicher Mechanismus, mit dem das menschliche Immunsystem die virale Latenz möglicherweise fördern könnte, ist die Inhibition der viralen Replikation durch Interferon- γ (IFN- γ), welche bereits *in vitro* gezeigt wurde (Abend et al., 2007). Übertragen auf die Situation im Patienten könnte eine latente Infektion des Virus in gesunden Individuen mit einer ausreichend hohen Anzahl an IFN- γ produzierenden T_H1-Zellen begünstigt werden. Sinkt die Zahl an T_H1-Zellen im Blut im Zuge einer Immunsuppression nach beispielsweise einer Nierentransplantation, könnte dies ein ausschlaggebendes Signal für die Reaktivierung des BKPyV sein (Imperiale und Jiang, 2016).

3.2.8 Zellkulturmodelle für die Replikation des BKPyV

Bei den ersten Untersuchungen der Infektion und Replikation des BKPyV in Zellkultur durch Howley et al. (1975) wurde die HEK-293-Zelllinie, sowie BKPyV-Isolate aus Patienten-Urin verwendet. Eine Charakterisierung des Genoms dieser BKPyV-Stämme nach mehrmaliger Passagierung lieferte in dieser Studie erste Hinweise auf Rearrangements der NCCR (Howley et al., 1975). Diese Rearrangements wurden näher charakterisiert und es wurde vermutet, dass Rearrangements nach Passagierung der Viren häufig als genetische Adaptation an die Zellkulturbedingungen entstehen (Rubinstein et al., 1987; Sundsfjord et al., 1990). Aufgrund der Relevanz archetypischer Stämme als persistierende und übertragbare Stämme wurden in den folgenden Jahren verschiedene Ansätze für eine stabile und effizientere Replikation archetypischer Viren in Zellkultur verfolgt.

Für die Expression von Papillomvirus-Vektoren, die einen SV40 ORI tragen, wurde von Buck et al. durch Transfektion von 293T-Zellen mit einem SV40-TAg-Expressionsvektor die 293TT-Zelllinie etabliert (Buck et al., 2004). Aufgrund der hohen TAg-Expression und der dadurch

erleichterten Replikation können 293TT-Zellen auch zur Anzucht archetypischer BKPyV-Stämme ohne Auftreten von Rearrangements verwendet werden (Broekema und Imperiale, 2012). Daneben wurden ebenfalls Replikationssysteme für archetypische BKPyV in der endothelialen Zelllinie HUV-EC-C, sowie in Vero-Zellen afrikanischer Meerkatzen beschrieben (Hanssen Rinaldo et al., 2005; Li et al., 2013; Eash et al., 2004). Da die Epithelzellen der proximalen Nierentubuli (RPTEC) allgemein als Hauptort der Persistenz des BKPyV angesehen werden, bilden diese Modelle die Realität im Patienten nur ungenügend ab.

Bislang wurde eine Studie zur Infektion von primären RPTEC mit archetypischen Stämmen veröffentlicht. Jedoch konnten auch 35 Tage nach der Infektion keine Nachkommen-Virionen und damit keine effiziente Replikation in diesem System nachgewiesen werden (Hanssen Rinaldo et al., 2005). Deshalb haben sich bei den meisten am BKPyV forschenden Arbeitsgruppen für Studien des BKPyV-Lebenszyklus Infektionsmodelle mit rearrangierten Stämmen, wie z. B. Dunlop durchgesetzt (Broekema et al., 2010). Diese haben im Vergleich zu den beschriebenen Modellen für archetypische BKPyV den Vorteil einer schnelleren und effizienteren Replikation. Da Rearrangements im Plasma von nur etwa 24% und im Urin von nur etwa 8% aller Nierentransplantierten mit Virämie nachweisbar sind, spiegeln diese Modelle nur den Zustand in einer sehr geringen Patientenpopulation wider (Gosert et al., 2008). Ein stabiles Replikationssystem für archetypische BKPyV in RPTEC, mit dem es möglich ist, die Infektion und Reaktivierung des BKPyV vor der Entstehung von Rearrangements zu untersuchen, wurde bis heute nicht veröffentlicht.

3.2.9 BKPyV-assoziierte Erkrankungen und therapeutische Ansätze

Nach der Primärinfektion kann bei etwa 5-10% der infizierten und immunkompetenten Personen bisweilen eine asymptomatische Virurie nachgewiesen werden (Jiang et al., 2009b). In immunsupprimierten Patienten kann eine Reaktivierung des Virus schwere Komplikationen hervorrufen. Die verbreitetsten und am besten beschriebenen BKPyV-assoziierten Erkrankungen sind die Polyomavirus-assoziierte Nephropathie (PVAN), die hauptsächlich in Nierentransplantierten auftritt, sowie die hämorrhagische Zystitis (HC) als Komplikation bei Knochenmarktransplantationen.

3.2.9.1 Polyomavirus-assoziierte Nephropathie (PVAN)

Nach Nierentransplantation kann in bis zu 80% der Patienten eine Virurie nachgewiesen werden. Bei bis zu 10% der Patienten entwickelt sich eine PVAN. Die Entwicklung effizienter immunsuppressiver Therapien bei Organtransplantationen begünstigt die Reaktivierung des BKPyV und folglich konnte über die Jahre eine steigende medizinische Relevanz der PVAN

verzeichnet werden (Bennett et al., 2012; Ramos et al., 2009). Aufgrund der dauerhaften Immunsuppression bei Nierentransplantierten ist die PVAN nicht auf einen bestimmten Zeitraum nach der Transplantation begrenzt, sondern kann jederzeit auftreten. Durchschnittlich tritt sie in Woche 44 nach der Transplantation auf. Von einer PVAN wird allgemein gesprochen, sobald eine Virämie mit Viruslasten $>10^4$ Kopien/ml im Plasma nachweisbar ist (Hirsch und Steiger, 2003). Durch die hohe virale Replikation im Spenderorgan kommt es bei einer PVAN zu starken Gewebeschäden und einer Infiltration von Immunzellen des angeborenen Immunsystems, was bei der Mehrzahl der Betroffenen zu einem schnellen Verlust des Transplants führt (Hirsch und Steiger, 2003; Ramos et al., 2009). Ein wichtiger Faktor bei der Entstehung der PVAN stellt die (Re-)Infektion des Transplantatempfängers mit persistierendem BKPyV aus dem Spenderorgan dar. Durch das Transplantat können für das Immunsystem des Empfängers unbekannte BKPyV-Serotypen in den Körper gelangen. Bei diesen Patienten ist die Wahrscheinlichkeit der Entstehung einer PVAN aufgrund des Mangels an neutralisierenden Antikörpern erhöht (Pastrana et al., 2013; Schmitt et al., 2014). Auch Rearrangements der NCCR können bei der Entstehung und Prognose einer PVAN eine große Rolle spielen. Bei etwa 24% der Patienten mit BKPyV-Reaktivierung und Virämie treten rearrangierte Stämme auf, bei Patienten mit PVAN erhöht sich der Prozentsatz auf bis zu 50%. Diese Rearrangements erhöhen durch ihre gesteigerte Replikationsrate das Risiko einer zytopathologischen Manifestation der hohen viralen Replikation (Gosert et al., 2008).

3.2.9.2 Hämorrhagische Zystitis

Nach allogener Stammzelltransplantation kommt es bei etwa 50% der betroffenen Patienten zur Reaktivierung und Replikation des BKPyV. Eine HC tritt in etwa 5-15% der Patienten durchschnittlich 50 Tage nach der Transplantation auf. Die genauen Mechanismen der Entstehung einer HC sind nicht abschließend geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass die Konditionierung der Patienten vor der Transplantation eine Rolle bei der Pathogenese spielt. Vor allem eine Behandlung der Patienten mit Cyclophosphamid oder Busulphan scheint Schäden am Blasenepithel durch urotoxische Nebenwirkungen der Medikamente hervorzurufen, was die Replikation des BKPyV begünstigen könnte (Rinaldo et al., 2013; Hirsch und Steiger, 2003). Da die HC häufig in der Immunrekonstitutionsphase auftritt wurde postuliert, dass für ihre Entstehung auch eine Immunantwort notwendig ist. Vor allem Granulozyten und NK-Zellen wurden mit der Entstehung einer HC in Verbindung gebracht (Hirsch und Steiger, 2003).

3.2.9.3 Behandlung und Therapie

Die Behandlung BKPyV-assoziiierter Erkrankungen gestaltet sich bis heute schwierig, denn es gibt noch kein spezifisch gegen das BKPyV zugelassenes Medikament. Bei Nierentransplantierten mit BKPyV-Replikation ist eine Reduktion der Immunsuppression zur Aktivierung der Immunantwort

das Mittel der Wahl, wobei als Nebeneffekt ebenfalls eine Abstoßungsreaktion des Transplantats auftreten kann (Hirsch und Steiger, 2003; Knowles, 2006). Tests mit dem gegen CMV-assoziierte Erkrankungen zugelassenen Nukleotidanalogen Cidofovir zeigten *in vitro* und *in vivo* teilweise vielversprechende Ergebnisse, sein Nutzen bei der Behandlung der PVAN ist in der Praxis jedoch beschränkt. Dies ist unter anderem auf die potenziell nephrotoxischen Nebenwirkungen des Medikaments zurückzuführen (Rinaldo et al., 2010; Gonzalez et al., 2015; Ortiz et al., 2005).

Eine weitere Medikamentenklasse, die gegen die Reaktivierung des BKPyV getestet wurde, ist die Klasse der Chinolon-Antibiotika. Durch ihre Inhibition, sowohl der Topoisomerase der Wirtszelle, als auch der Helikase-Aktivität des TAg, konnte eine inhibitorische Wirkung auf die virale DNA-Replikation nachgewiesen werden (Wright und Gill, 2016; Ali et al., 2007). Durch die fehlende Selektivität der Chinolon-Antibiotika konnten jedoch zum einen starke Nebenwirkungen beobachtet werden, zum anderen war die inhibitorische Wirkung auf die virale Replikation in einigen klinischen Studien nicht zufriedenstellend (Randhawa, 2005; Wright und Gill, 2016).

Häufig diskutiert wird zudem der Einfluss der Immunsuppressiva auf die Replikation des BKPyV in Nierentransplantierten. In Zellkulturversuchen konnte gezeigt werden, dass der mTOR-Inhibitor Sirolimus die Viruslast infizierter Zellen senken kann. Bei einer Gabe von Sirolimus direkt nach der Infektion konnte nach drei Tagen eine um über 90% reduzierte Viruslast der Zellen nachgewiesen werden. Eine Gabe 48 Stunden nach der Infektion oder später führte allerdings zu keiner Reduktion der Viruslast. Tacrolimus hatte in dieser Studie im Gegensatz zu Sirolimus einen förderlichen Effekt auf die virale Replikation (Hirsch et al., 2016). Auch das als Immunsuppressivum verwendete Leflunomid zeigte sowohl in Zellkultur, als auch in klinischen Studien einen inhibitorischen Effekt auf die virale Replikation (Bernhoff et al., 2010; Gonzalez et al., 2015). In anderen Studien konnte im Gegensatz dazu keine ausreichende Wirksamkeit bzw. unerwünschte Nebenwirkungen bei der Behandlung mit Leflunomid nachgewiesen werden (Guasch et al., 2010).

Ebenfalls wurde in den letzten Jahren ein Therapieansatz mit intravenösen Immunglobulinen (IVIG) diskutiert. Die als Medikament zugelassenen Präparate enthalten neutralisierende Antikörper gegen alle Serotypen des BKPyV (Randhawa et al., 2015). Ein Therapieerfolg konnte in der Praxis jedoch nicht zweifelsfrei belegt werden (Sener et al., 2006). Zudem handelt es sich bei IVIG um sehr teure Präparate, die auch mit möglicherweise starken Nebenwirkungen in Zusammenhang gebracht werden (Sener et al., 2006; Wittstock et al., 2003). Folglich ist eine gute Abschätzung des Nutzen-Risiko-Verhältnisses bei einer Therapie der PVAN mit IVIG, wie auch bei der Therapie mit den anderen erwähnten Medikamenten, dringend erforderlich.

3.3 Zellzyklus

3.3.1 Definition und Phasen

Als Zellzyklus wird die Gesamtheit der zellulären Mechanismen und Abläufe von der Duplikation der genomischen DNA bis zur Teilung der Zelle in zwei Tochterzellen bezeichnet. Der Zellzyklus lässt sich allgemein in vier Phasen einteilen. In der G1-Phase des Zellzyklus wird die Duplikation des Genoms vorbereitet, die anschließend in der S-Phase abläuft. In der G2-Phase kommt es zur Vorbereitung der Zellteilung. Dabei werden unter anderem die duplizierten Chromosomen getrennt und die Kernmembran aufgelöst. Die eigentliche Teilung der Zelle in zwei Tochterzellen findet anschließend in der M-Phase statt (Salazar-Roa und Malumbres, 2017). Alternativ kann eine Zelle von der G1-Phase in die sogenannte G0-Phase übergehen, was als Austritt aus dem Zellzyklus zu verstehen ist. Dieser Zustand ist prinzipiell reversibel, was bedeutet, dass unter entsprechenden Umständen ein Wiedereintritt in die G1-Phase des Zellzyklus möglich ist. Diese Mechanismen spielen vor allem in Stammzellen eine große Rolle (Terzi et al., 2016).

3.3.2 Regulation des Übertritts in die S-Phase

Damit eine unkontrollierte Zellteilung und damit eine Tumorentstehung vermieden werden kann, gibt es beim Übergang von einer Zellzyklus-Phase in die andere sogenannte „Checkpoints“. Diese Checkpoints sind zelluläre Mechanismen, die gewährleisten, dass alle notwendigen Voraussetzungen für einen Übergang erfüllt sind. Eine Fehlregulation der stattfindenden Prozesse führt in gesunden Zellen zum Arrest des Zellzyklus und/oder zur Apoptose der Zelle (Hartwell und Weinert, 1989). Ein sehr gut untersuchter und für die Krebsentstehung relevanter Zellzyklus-Checkpoint ist der Checkpoint beim Übergang der G1- in die S-Phase.

Die Phasen-Übergänge werden hauptsächlich durch die Aktivität von Cyclinen und CDK, sowie deren Inhibitoren reguliert. Die Aktivität der Cycline und CDK ist abhängig von ihrer direkten Interaktion miteinander, wodurch die Kinase-Aktivität der CDK aktiviert wird (Galderisi et al., 2003). In den unterschiedlichen Phasen sind unterschiedliche Cyclin/CDK Paare aktiv. Am Übertritt von der G1- in die S-Phase sind vor allem die Cycline D und E beteiligt. Ein weiterer Schlüsselfaktor bei der DNA-Replikation und Zellproliferation sind Proteine der E2F-Familie. Bei E2F handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die durch die Regulation ihrer Zielgene den eigentlichen Übertritt in die S-Phase einleiten oder inhibieren können. Zu den positiven Regulatoren des Zellzyklus gehören E2F1-3, zu den negativen Regulatoren gehören E2F4-8 (Grant und Cook, 2017; Galderisi et al., 2003). Abbildung 6 zeigt einen vereinfachten und schematischen Überblick über die wichtigsten Signale beim Übergang der G1- in die S-Phase.

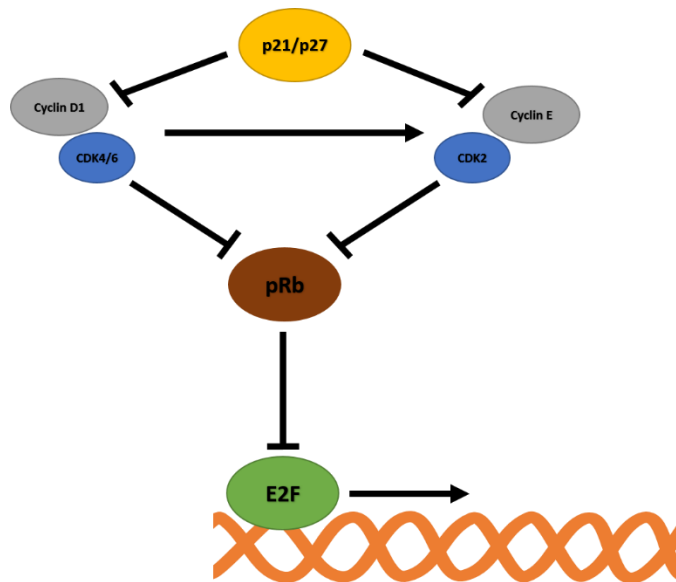


Abbildung 6: Schematische Übersicht über die Regulation des S-Phase-Übergangs.

Die Assoziation von Cyclin D1 mit CDK4/6 und von Cyclin E mit CDK2 führt zur Hyperphosphorylierung von pRb, wodurch es nicht mehr in der Lage ist mit E2F zu interagieren und die E2F-abhängige Expression von Zielgenen zum S-Phase-Übergang zu unterdrücken. Die Tumorsuppressoren p21 und p27 können die Aktivität der Cyclin/CDK Komplexe inhibieren, was zu einem Zellzyklusarrest führt.

Durch die Assoziation von Cyclin D mit CDK4 bzw. CDK6 werden Cyclin E und CDK2 hochreguliert und das Retinoblastoma-Protein (pRb) phosphoryliert. Der Cyclin E/CDK2 Komplex ist dann wiederum selbst in der Lage pRb zu (hyper-)phosphorylieren, wodurch es in seiner Funktion inhibiert wird. Im nicht-phosphorylierten Zustand ist pRb aktiv und unterdrückt die E2F-abhängige Genexpression durch eine direkte Interaktion (Hinds et al., 1992; Grant und Cook, 2017). Weitere wichtige Zellzyklusinhibitoren neben pRb sind p21 und p27. Beide gehören einer gemeinsamen Proteinfamilie an und können durch eine direkte Bindung die Kinase-Aktivität des Cyclin E/CDK2 Komplexes inhibieren (Harper et al., 1993; Toyoshima und Hunter, 1994; Grant und Cook, 2017). Bekannt ist das Gen von p21 vor allem als direktes Zielgen von p53 (el-Deiry et al., 1993).

3.4 Retinoide

3.4.1 Struktur und Klassifizierung

Bei den Retinoiden handelt es sich um chemische Substanzen, die sich strukturell oder funktionell von Vitamin A (Retinol), bzw. den aktiven Metaboliten des Retinols, den Retinsäuren ableiten lassen. Im allgemeinen Sprachgebrauch wird der Begriff „Retinsäure“ als Synonym für das *all-trans*-Isomer der Retinsäure (ATRA, Tretinoin) verwendet. ATRA bildet zusammen mit dem Retinol, Isotretinoin (*13-cis*-Retinsäure) und Alitretinoin (*9-cis*-Retinsäure) die erste Generation der Retinoide (Khalil et al., 2017). Die Unterteilung der Retinoide in unterschiedliche Generationen

erfolgt aufgrund ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten. Abbildung 7 zeigt eine Übersicht über die relevantesten Retinoide der verschiedenen Generationen sowie deren Strukturformel.

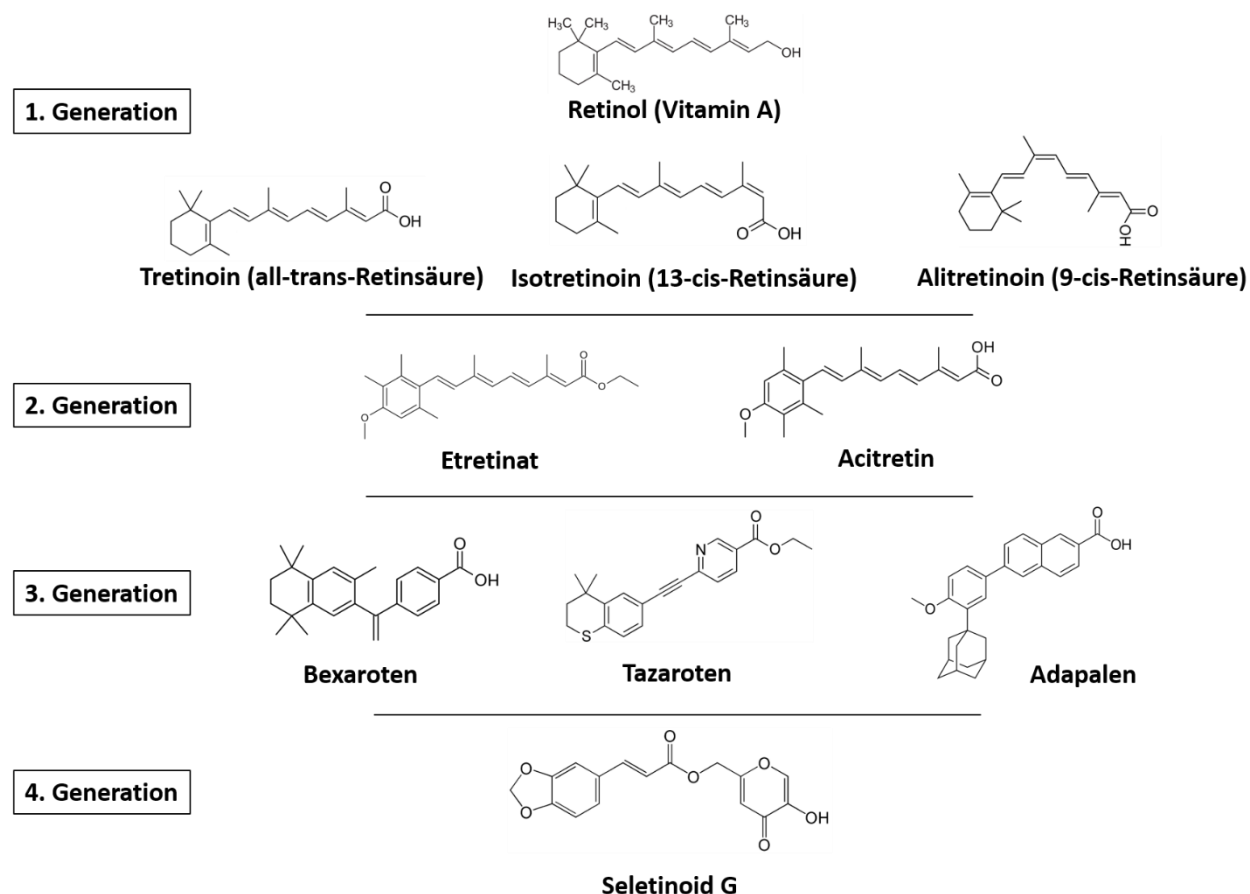


Abbildung 7: Gliederung der Retinoide in vier Generationen.

Aufgrund struktureller Unterschiede werden die Retinoide in vier Generationen untergliedert. Die erste Generation (nicht-aromatische Retinoide) enthält neben Retinol verschiedene Isoformen der Retinsäure. Die wichtigsten Retinoide der zweiten Generation (mono-aromatische Retinoide) sind Etretinat und Acitretin. Bexaroten, Tazaroten und Adapalen sind die wichtigsten Vertreter der dritten Generation (poly-aromatische Retinoide). Die vierte Generation (Pyranone) besteht bislang nur aus Seletinoid G. Einteilung nach Mukherjee et al. (2006) und Khalil et al. (2017).

Die Retinoide der ersten Generation sind ausschließlich natürlich vorkommende, nicht-aromatische Retinoide (Mukherjee et al., 2006). Aufgrund ihrer vielfältigen zellulären Funktionen und ihres dadurch bedingten Potenzials als Arzneistoffe (siehe Abschnitte 3.4.2 und 3.4.3) wurden in den letzten Jahren ständig neue Retinoide mit optimierten chemischen und pharmakologischen Eigenschaften künstlich synthetisiert. Die zweite Generation der Retinoide besteht bereits ausschließlich aus synthetisch hergestellten Retinoiden. Zu den Retinoiden der zweiten Generation, die aufgrund ihrer Struktur auch als mono-aromatische Retinoide bezeichnet werden, zählen unter anderem Acitretin, sowie dessen aktive Form Etretinat (Khalil et al., 2017). Die dritte Generation der Retinoide besteht aus polyaromatischen Stoffen wie Bexaroten, Adapalen und Tazaroten (Mukherjee et al., 2006; Khalil et al., 2017). Das neuste beschriebene Retinoid stellt

der Pyranon-artige Stoff Seletinoid G dar (Kim et al., 2005). Auch wenn Seletinoid G wenige strukturelle Gemeinsamkeiten mit den Retinoiden der vorherigen Generationen hat, wird es allgemein einer vierten Retinoid-Generation zugeordnet (Mukherjee et al., 2006). Eine weitere Substanz, die ebenfalls eine mit den Retinoiden vergleichbare Struktur besitzt und aufgrund ihrer Eigenschaften und zellulären Funktionen ebenfalls zu den Retinoiden gezählt wird, ist Fenretinid (Fanjul et al., 1996).

3.4.2 Zelluläre Funktionen

Die hauptsächlichsten Funktionen der Retinoide werden durch die Interaktion mit ihren Rezeptoren ausgeübt. Sowohl die natürlich vorkommenden, als auch die synthetischen Retinoide sind Liganden für die Retinsäure-Rezeptoren (RAR) und die Retinoid-X-Rezeptoren (RXR) (Petkovich et al., 1987; Mangelsdorf et al., 1990). Diese beiden Rezeptorgruppen gehören zur Familie der Kernrezeptoren. Sowohl von den RAR, als auch den RXR unterscheidet man die drei Subtypen α , β und γ , die durch unterschiedliche Gene kodiert werden. Nach der Ligandenbindung kommt es zur Dimerisierung, wodurch die daraus entstehenden Dimere im Zellkern als Transkriptionsfaktor fungieren und die Genexpression ihrer Zielgene regulieren können (Chambon, 1996). Neben einer Homodimerisierung zweier RAR oder RXR können die Retinoidrezeptoren ebenfalls Heterodimere mit anderen Kernrezeptoren wie z. B. Rezeptoren der Familie der Thyroid-Hormon-Rezeptoren, Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren, Vitamin-D-Rezeptoren und Leber-X-Rezeptoren bilden (Aranda und Pascual, 2001). Durch diese vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten sind Retinoidrezeptoren in der Lage die Expression von mehr als 500 Genen zu regulieren (Balmer und Blomhoff, 2002). Die charakteristischen DNA-Bindemotive der RAR/RAR- oder RAR/RXR-Dimere werden *Retinoic acid response element* (RARE) genannt, da deren Bindeaktivität durch eine Stimulation der Zelle mit ATRA induzierbar ist (Chambon, 1996).

Schon ab dem Stadium der Embryonalentwicklung des Menschen und anderer Wirbeltiere spielen Retinoide eine große Rolle. Bereits in den 1950er Jahren konnte ein Zusammenhang von embryonalen Fehlbildungen und einem Vitamin A-Mangel der Mutter beobachtet werden (Wilson et al., 1953). In Ratten konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Fehlbildungen unter anderem durch Vitamin A-Überschuss hervorgerufen werden können (Cohlan, 1953). Heute weiß man, dass Retinoide und Retinoidrezeptoren bereits in frühen Stadien der Embryonalentwicklung aktiv sind und verschiedene Rezeptor-Subtypen bei Wirbeltieren entlang der anterior/posterioren Hauptachse des Embryos exprimiert werden (Ross et al., 2000; Durston et al., 1997). Zudem fungieren Retinoidrezeptoren als Aktivatoren und Repressoren der Expression verschiedener Hox-Gene, was für die Embryonalentwicklung essenziell ist (Marshall et al., 1992; De Luca und

Ross, 1996; Ross et al., 2000). Aufgrund dieser Funktionen und den damit verbundenen teratogenen Eigenschaften, dürfen Retinoide während der Schwangerschaft nicht als Medikament genommen werden (Means und Gudas, 1995).

Eine wichtige Funktion der Retinoide und ihrer Rezeptoren ist die Regulation der Zellproliferation und -differenzierung. Unter anderem konnte nachgewiesen werden, dass Retinoidrezeptoren nach Ligandenbindung in der Lage sind, die Tumorsuppressorproteine p21 und p27 auf transkriptioneller Ebene hochzuregulieren und die Aktivität von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) zu senken. Dadurch sind sie in der Lage einen Zellzyklusarrest bzw. eine Differenzierung in der Zelle zu induzieren (Liu et al., 1996; Li et al., 2004; Borriello et al., 2000). Aufgrund dieser Funktionen spielt das RAR/RXR-Signaling auch bei der Differenzierung von Immunzellen eine große Rolle. Bedingt durch die Komplexität des RAR/RXR-Signalings sind seine immunmodulatorischen Funktionen ebenfalls sehr komplex. Beispielsweise kann durch eine Stimulation mit ATRA die Differenzierung und Polarisierung von T-Zellen induziert werden. Abhängig von der Dosis sind aber auch gegensätzliche Effekte möglich (Larange und Cheroutre, 2016). Beispielsweise Antigen-präsentierende Zellen wie dendritische Zellen sind in der Lage selbst ATRA aus Vitamin A zu synthetisieren und durch dessen Ausschüttung die Immunantwort durch T-Zellen und anderen Immunzellen zu beeinflussen (Hall et al., 2011; Coombes et al., 2007; Larange und Cheroutre, 2016).

3.4.3 Retinoide als Medikamente

Die Einsatzgebiete der Retinoide als Medikamente ergeben sich aus ihren im vorherigen Abschnitt beschriebenen immunmodulatorischen Wirkungen und der Regulation des Zellzyklus. Bereits 1969 wurde eine Wirkung von topisch angewandtem Tretinoin gegen gewöhnliche Akne beschrieben (Kligman et al., 1969). Darauf folgte eine Zulassung als Arzneimittel und Retinoide werden bis heute häufig gegen Akne oder andere entzündliche Hautkrankheiten eingesetzt. Neben Tretinoin und Isotretinoin sind mit Adapalen und Tazaroten auch zwei Retinoide der dritten Generation zur topischen Anwendung zugelassen. Weitere topische Anwendungsgebiete dieser Retinoide sind unter anderem Psoriasis und Ichtyose. Bei manchen entzündlichen Hautkrankheiten oder Verlaufsformen kann auch eine systemische Anwendung der Retinoide indiziert sein. Zur systemischen Behandlung zugelassen sind Tretinoin, Isotretinoin, Acitretin und Bexaroten (Khalil et al., 2017).

Diese werden darüber hinaus zur Chemoprophylaxe und Behandlung verschiedener Tumorerkrankungen eingesetzt. Tretinoin ist zugelassen zur Behandlung von akuter myeloischer Leukämie, Isotretinoin wird in Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren zur Chemoprävention weiterer

Primärtumore eingesetzt, ist aber aufgrund starker Nebenwirkungen in seiner systemischen Anwendung umstritten (Wang und Chen, 2008; Perry et al., 2005). Acitretin ist in erster Linie für die systemische Behandlung von Psoriasis zugelassen, wurde jedoch ebenfalls bei Hautveränderungen und malignen Hauterkrankungen nach Nierentransplantationen erfolgreich eingesetzt (Menter et al., 2009; Yuan et al., 1995). Bexaroten ist für die Behandlung von kutanen T-Zell-Lymphomen zugelassen, wurde im *Off-Label-Use* und in weiteren klinischen Studien bereits positiv gegen andere Krebsarten wie z. B. nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome und Brustkrebs getestet (Querfeld et al., 2006; Dragnev et al., 2018; Chen et al., 2017). Desweiteren konnte in Mäusen gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Bexaroten zum Abbau von β -Amyloidplaques im Hirn beiträgt, was es ebenfalls für die Alzheimerforschung interessant macht (Cramer et al., 2012).

Fenretinid ist noch nicht als Medikament zugelassen, jedoch konnte in bisher veröffentlichten Studien eine hohe Selektivität für RAR- α und - β bei nur geringen Nebenwirkungen nachgewiesen werden (Fanjul et al., 1996; Hail et al., 2006). Eine vielversprechende Wirkung von Fenretinid konnte vor allem bei der Behandlung von Neoplasien beobachtet werden, weshalb es zurzeit in klinischen Studien gegen verschiedene Krebstypen getestet wird (Cooper et al., 2017). Unabhängig davon konnte gezeigt werden, dass Fenretinid die Ceramidkonzentration bei Mukoviszidosepatienten in betroffenen Organen erhöht, wodurch beispielsweise einer Lungeninfektion durch *Pseudomonas aeruginosa* vorgebeugt werden kann (Guilbault et al., 2008). Während vor allem die Retinoide der ersten Generation oftmals starke Nebenwirkungen aufweisen, sind die Retinoide der neueren Generationen allgemein besser verträglich. Diese bessere Verträglichkeit im Vergleich zu den natürlichen Retinoiden resultiert aus einer allgemein höheren Rezeptorselektivität der synthetischen Retinoide (Uray et al., 2016).

3.5 Ziele dieser Arbeit

In einer vorangegangenen Masterarbeit wurde ein neues Replikationssystem für archetypische Stämme des BKPyV in primären Nierenepithelzellen proximaler Tubuli (RPTEC) entwickelt. Mit Hilfe dieses Systems ist es erstmals möglich, neben der Replikation rearrangierter BKPyV-Stämme eine stabile und effiziente Replikation klinisch isolierter archetypischer BKPyV-Stämme, also Stämme mit unveränderter nicht-kodierender Kontrollregion (NCCR) zu etablieren. In dieser Arbeit sollen mit Hilfe des zuvor genannten Systems zunächst verschiedene Parameter der Infektion und Replikation des archetypischen WWM12-Stammes mit denen des rearrangierten Dunlop-Stamms verglichen werden. Dieser Vergleich beinhaltet die virale Replikationsrate, sowie die Expression der viralen Proteine. Zur Identifizierung neuer Therapieansätze soll zum einen die Expression der Zellzyklusregulatoren Cyclin E1, E2 sowie CDK1 und CDK2 in infizierten RPTEC untersucht werden. Zum andern soll die Wirkung eines Inhibitors der Cyclin-abhängigen Kinase 1, sowie die von Vertretern der Substanzklasse der Retinoide auf die Replikation von WWM12 und Dunlop, wie auch das Zellwachstum getestet werden. Der Mechanismus aussichtsreicher potenziell antiviraler Wirkstoffe soll anschließend aufgeklärt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Zellkultur

4.1.1.1 Eukaryotische Zellen

293TT-Zellen

Zur Etablierung der 293TT-Zelllinie wurden 293T-Zellen von Buck et al. (2004) stabil mit einem Expressionsplasmid für das TAg des SV40 transfiziert (Buck et al., 2004). Die Zelllinie wurde von Christopher Buck bezogen.

Primäre Nierenepithelzellen proximaler Tubuli (RPTEC)

Bei Patienten mit Nierenzellkarzinom wurde in der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums des Saarlandes eine Exzision des Tumors durchgeführt. Gesundes kortikales Nierengewebe, welches bei dieser Operation in geringem Maße ebenfalls mit entnommen wurde, wurde für die Zellisolation von Martin Janssen aus der Klinik für Urologie zur Verfügung gestellt. Der Transport der Proben erfolgte in Nierentransportmedium. Aus diesem Gewebe wurden kortikale Nierenzellen isoliert und RPTEC wurden aus diesem Zellgemisch mittels immunomagnetischer Separation selektioniert (siehe Abschnitt 4.2.1.1). Ein entsprechender Ethikantrag liegt vor. Die Spender wurden anonymisiert.

4.1.1.2 Reagenzien für die Zellkultur

Adenin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm
Amphotericin B	Sigma-Aldrich, Steinheim
Choleratoxin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Difco LB Broth, Miller (Luria-Bertani) Medium	BD Pharmingen, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
High Glucose	
DMEM/Ham's F12 Nutrient Mixture 2:1	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Gibco, Karlsruhe
Epidermal Growth Factor (EGF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Karlsruhe
Hitzeinaktiviert für 30 min bei 56°C	
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, Steinheim

Hygomyacin B	Applichem, Darmstadt
Insulin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumpyruvat [100 mM]	Sigma-Aldrich, Steinheim
OptiMEM	Gibco, Karlsruhe
Penicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640) mit L-Glutamin und Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Transferrin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triiodthyronin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin/EDTA-Lösung [0,5 g/l Trypsin; 0,2 g/l EDTA]	Sigma-Aldrich, Steinheim
REBM Basal Medium	Lonza, Köln
REGM SingleQuots Supplements	Lonza, Köln

4.1.1.3 Zellkulturmedien

Medium für 293TT Zellen

DMEM High Glucose	
FKS	10%
Natriumpyruvat	100 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Hygromycin B	400 µg/ml

Hygromycin B wurde dem Medium frisch in der Zellkulturflasche zugesetzt.

Nierentransportmedium

DMEM High Glucose	
Penicillin	200 U/ml
Streptomycin	200 µg/ml
Amphotericin B	25 µg/ml

Medium für primäre kortikale Nierenzellen

RPMI-1640	
FKS	10%
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Amphotericin B	25 µg/ml

RPTEC Kultivierungsmedium (FAD Medium; Wu et al., 1982)

DMEM High Glucose und DMEM/Ham's F12 im Verhältnis 1:1	
FKS	10%
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Adenin	$1,8 \times 10^{-4}$ M
Choleratoxin	10^{-10} M
EGF	10 ng/ml
Hydrocortison	0,4 µg/ml
Insulin	5 µg/ml
Transferrin	5 µg/ml
Triiodthyronin	2×10^{-11} M

BKPyV Infektionsmedium (BKIM)

DMEM High Glucose und DMEM/Ham's F12 im Verhältnis 1:1	
FKS	10%
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Choleratoxin	10^{-10} M
Insulin	5 µg/ml
Triiodthyronin	2×10^{-11} M

Renal epithelial growth medium (REGM)

Zur Herstellung des REGM wurden die REGM *SingleQuots Supplements* dem REBM *Basal Medium* zugegeben.

LB-Amp Medium

LB-Medium

Ampicillin 10 µg/ml

4.1.1.4 Medikamente

Acitretin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Adapalen	Sigma-Aldrich, Steinheim
ATRA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bexaroten (Targretin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fenretinid	TCI Deutschland, Frankfurt
Teriflunomid (A1771726)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ro-3306	Selleckchem, München

Alle verwendeten Medikamente wurden in DMSO gelöst. 1000-fach konzentrierte Stocklösungen wurden bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

4.1.2 BKPyV-Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme WWM12, WWT und M401 sind klinische Isolate aus dem Urin von Patienten des UKS in Homburg. Zur Charakterisierung dieser Isolate wurde die Sequenz der NCCR bestimmt. Das Isolat, welches zur Anzucht des M401 verwendet wurde, konnte mittels Sequenzierung aufgrund starker Mischsequenzen nicht genau charakterisiert werden. Diese Mischsequenzen lassen auf eine Vielzahl verschiedener (potenziell rearrangierter) Varianten der NCCR in diesem Isolat schließen. Die Sequenzierung M401-Stocks nach der Anzucht in 293TT-Zellen ergab eine NCCR-Sequenz mit 12 Punktmutationen im Vergleich zum bereits veröffentlichten WWM4-Stamm (GenBank: JQ513595.1) als Hauptspezies. Auch bei dieser Sequenzierung traten starke Mischsignale auf, weshalb der Stamm in den Experimenten dieser Arbeit als potenziell rearrangierter Stamm verwendet wurde. Die ermittelte Sequenz der Hauptspezies-NCCR ist im Abschnitt 7.1 des Anhangs dargestellt.

4.1.3 Dunlop-Plasmid

Das BKV Dunlop Plasmid wurde in Form von transformierten Bakterien (E. coli Stamm DH5alpha) freundlicherweise von Peter Howley zur Verfügung gestellt (Addgene Plasmid # 25466).

4.1.4 Antikörper

Tabelle 2: Liste aller in dieser Arbeit verwendeter Antikörper.

Antigen	Klon	Spezies	Methode	Konzentration	Firma
c-Fos	polyklonal (4)X	Kaninchen	EMSA	2 µg/Ansatz	Santa Cruz, Heidelberg
CD13	WM15	Maus	RPTEC Isolation FACS	5 µg/10 ⁷ Zellen 1:500	Abcam, Cambridge, UK
CDK1	EPR165	Maus	Westernblot	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
CDK2	D-12	Maus	Westernblot	1:100	Santa Cruz, Heidelberg
cJun	polyklonal (N)X	Kaninchen	EMSA	2 µg/Ansatz	Santa Cruz, Heidelberg
Cyclin E1	E-4	Maus	Westernblot	1:100	Santa Cruz, Heidelberg
Cyclin E2	A-9	Maus	Westernblot	1:500	Santa Cruz, Heidelberg
GGT1	E-5	Maus	Immunfluoreszenz	1:200	Santa Cruz, Heidelberg
Fra-1	polyklonal (R20)X	Kaninchen	EMSA	2 µg/Ansatz	Santa Cruz, Heidelberg
Fra-2	polyklonal (Q20)X	Kaninchen	EMSA	2 µg/Ansatz	Santa Cruz, Heidelberg
JunB	polyklonal (210)X	Kaninchen	EMSA	2 µg/Ansatz	Santa Cruz, Heidelberg
JunD	polyklonal (329)X	Kaninchen	EMSA	2 µg/Ansatz	Santa Cruz, Heidelberg
Kaninchen IgG Isotyp	polyclonal EPR25A	Kaninchen	EMSA	2 µg/Ansatz	Abcam, Cambridge, UK
Kaninchen IgG AlexaFluor 546 gekoppelt	polyklonal	Ziege	FACS	1:1000	Thermo Scientific, Braunschweig
large T-Antigen	pAb416	Maus	Westernblot Immunfluoreszenz	1:100 1:100	Santa Cruz, Heidelberg
Maus IgG AlexaFluor488 gekoppelt	polyklonal	Ziege	FACS	1:1000	Thermo Scientific, Braunschweig
Maus IgG FITC gekoppelt	polyklonal	Ziege	Immunfluoreszenz	1:200	Sigma Aldrich, Steinheim
Maus IgG Isotyp	polyclonal sc-3877	Maus	FACS	1:500	Santa Cruz, Heidelberg
Maus IgG Microbeads gekoppelt	-	Ratte	RPTEC Isolation	20 µl/10 ⁷ Zellen	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
VP1	polyklonal ab53977	Kaninchen	Westernblot Immunfluoreszenz	1:5000 1:200	Abcam, Cambridge, UK
VP2/3	polyklonal ab53983	Kaninchen	Westernblot Immunfluoreszenz	1:5000 1:200	Abcam, Cambridge, UK

Die Antikörper gegen das TAg, VP1 und VP2/3 sind gegen ein Epitop der entsprechenden Proteine des SV40 gerichtet, zeigen jedoch eine Kreuzreaktivität gegen die Proteine des BKPyV.

4.1.5 Oligonukleotide

4.1.5.1 Reverse Transkription

Zur reversen Transkription von mRNA wurden zufällige Hexamer-Primer (5' – NNNNNN – 3') verwendet.

4.1.5.2 PCR

Nested PCR (Gosert et al., 2008)

Primer BKTT5	5' – GAGCTCCATGGATTCTTC – 3'
Primer BKTT6	5' – CCAGTCCAGGTTTTACCA – 3'
Primer BKTT7	5' – CCCTGTTAAGCACTTTATCCATTT – 3'
Primer BKTT8	5' – AACTTTCACTGAAGCTTGTCGT – 3'

Viruslastbestimmung aus Überständen

Primer BKV-VP2-F	5' – GAGCTCCATGGATTCTTC – 3'
Primer BKV-VP2-B	5' – CCAGTCCAGGTTTTACCA – 3'
Sonde	5'-6FAM-AAGAACTGCTCCTCAATGGATGTTGCCTT--TMR-3'

Zur Herstellung des Primer-Sonden-Mixes wurden 3 nmol der Sonde in 1200 µl PCR-Wasser gelöst und mit je 60 µl der Primer-Stocks (100 µM) gemischt. 1080 µl PCR-Wasser wurden zugegeben. Die Primer liegen im Mix somit in einer 2,5 µM, die Sonde in einer 1,25 µM Endkonzentration vor. Der Mix wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Quantitative PCR mit cDNA

Tabelle 3: Primer, MgCl₂-Konzentration und verwendete UPL-Sonde für die cDNA PCR.

Gen	Primersequenzen	MgCl ₂ Konzentration	UPL Sonde
RPL13A	5' – AGCGGATGAACACCAACC – 3' 5' – TTTGTGGGGCAGCATACTC – 3'	4 mM	#28
CDK1	5' – TGGATCTGAAGAAATACTTGGATTCTA – 3' 5' – CAATCCCCTGTAGGATTTGG – 3'	3 mM	#36
CDK2	5' – GAGTCCCTGTTCGTACTIONTACACC – 3' 5' – AGCCCAGGCTCCAGATGT – 3'	7 mM	#74
CCNE1	5' – GGCCAAAATCGACAGGAC – 3' 5' – GGGTCTGCACAGACTGCAT – 3'	4 mM	#79
CCNE2	5' – GCCATTGATTCATTAGAGTTCCA – 3' 5' – TGAAATACTGTCCCCTCCAAAC – 3'	3 mM	#79

PCR zum Mykoplasmen-Nachweis

Primer sense	5' - CGCCTGAGTAGTACGTTTCGC - 3'
	5' - CGCCTGAGTAGTACGTACGC - 3'
	5' - TGCCTGGGTAGTACATTCGC - 3'
	5' - TGCCTGAGTAGTACATTCGC - 3'
	5' - CGCCTGAGTAGTATGCTCGC - 3'
	5' - CACCTGAGTAGTATGCTCGC - 3'
	5' - CGCCTGGGTAGTACATTCGC - 3'
Primer anti-sense	5' - GCGGTGTGTACAAGACCCGA - 3'
	5' - GCGGTGTGTACAAAACCCGA - 3'
	5' - GCGGTGTGTACAAAACCCGA - 3'

Von allen Primern wurden 100 µM Stocklösungen in H₂O angesetzt. Zur Herstellung des Primermixes wurde jeder Primer in H₂O auf 5 µM verdünnt und je 100 µl dieser Verdünnung miteinander gemischt (Endkonzentration je 0,5 µM).

4.1.5.3 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Tabelle 4: DNA-Oligos zur Verwendung in EMSA.

Name	Sequenzen (vorausgesagte Bindesequenz unterstrichen)
WD	5' - CCA AAC <u>CAT GAC CTC</u> AGG AAG G - 3' 5' - CCT TCC <u>TGA GGT CAT</u> GGT TTG G - 3'
W	5' - AAA GTG <u>CAT GAC TGG</u> GCA GCC AG - 3' 5' - CTG GCT <u>GCC CAG TCA TGC</u> ACT TT - 3'
DI	5' - AAA GTG <u>CAT GAC AGA</u> CAT GTT - 3' 5' - AAC ATG <u>TCT GTC ATG</u> CAC TTT - 3'
DII	5' - AAA GTG <u>CAT GAC TCA</u> CAG GGG AA - 3' 5' - TTC CCC <u>TGT GAG TCA TGC</u> ACT TT - 3'
AP-1 Konsensussequenz	5' - CGC TTG <u>ATG ACT CAG</u> CCG GAA - 3' 5' - TTC CGG <u>CTG AGT CAT</u> CAA GCG - 3'

4.1.6 Enzyme

EcoRI	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Maxima Reverse Transcriptase	Thermo Scientific, Braunschweig
T4 Ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
T4 Polynukleotidkinase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Taq Polymerase	Sigma-Aldrich, Steinheim

4.1.7 Reagenziensysteme (Kits)**Isolation von DNA oder RNA**

NucleoBond Xtra Maxi	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin miRNA	Macherey-Nagel, Düren
QiAmp Mini	Qiagen, Hilden

qRT-PCR

Light Cycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I	Roche, Mannheim
Light Cycler FastStart DNA MasterPLUS Hybprobe	Roche, Mannheim
FastStart Taq DNA Polymerase dNTP Pack	Roche, Mannheim

Westernblot

SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific, Braunschweig
---------------------------------------------------	---------------------------------

4.1.8 Puffer**4.1.8.1 Isolation von RPTEC und FACS****Kollagenase-Puffer**

RPMI-1640	
Kollagenase	0,1% (w/v)
BSA	10% (w/v)

Waschpuffer

DPBS	
BSA	0,5% (w/v)
EDTA	2 mM

4.1.8.2 Neutralrottest**Citratpuffer**

Ethanol vergällt	50% (v/v)
Dinatriumcitrat	30,6 mM
HCl	19,4 mM

4.1.8.3 Immunfluoreszenz**Blockingpuffer**

DPBS	
FKS	3% (v/v)

Färbepuffer

DPBS	
FKS	1% (v/v)

4.1.8.4 Durchflusszytometrie**FACS-Puffer**

DPBS	
BSA	1% (w/v)

FACS-Fix

H ₂ O	
NaCl	8,5 g/l
Paraformaldehyd	1% (w/v)

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

4.1.8.5 Elektronenmikroskopie**Fixans**

Glutaraldehyd	2,5% (v/v)
HEPES	0,05 M

4.1.8.6 PCR**TE-SS für qRT-PCR**

TE-Puffer	
Salmon Sperm DNA	40 ng/μl

10x Puffer für Mykoplasma-PCR

Tris HCl pH 8,85	750 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	200 mM

MgCl ₂	20 mM
Tween 20	1% (v/v)

10x Puffer/dNTP Mix für Mykoplasma PCR

10x Puffer	250 µl
dNTP Mix	20 µl

4.1.8.7 Proteinextraktion

Probenpuffer für Ganzzellextrakte

Tris, pH 6,8	130 mM
SDS	6% (w/v)
3-Mercapto-1,2-propandiol	10% (v/v)
Glycerol	10% (v/v)
Bromphenolblau	0,05% (w/v)

Puffer A für Kernextrakte

HEPES, pH 7,9 (mit KOH eingestellt)	10 mM
KCl	10 mM
EDTA pH 8,0 (mit KOH eingestellt)	0,1 mM
EGTA	0,1 mM
DTT	1 mM
PMSF	0,6 mM
Aprotinin	10 µg/ml
Leupeptin	10 µg/ml

Der Puffer A wurde ohne PMSF, Aprotinin und Leupeptin angesetzt und gelagert. Diese Substanzen wurden bei Verwendung frisch zugegeben.

Puffer C für Kernextrakte

HEPES, pH 7,9 (mit KOH eingestellt)	20 mM
NaCl	0,4 M
EDTA pH 8,0 (mit KOH eingestellt)	1 mM
EGTA	1 mM
DTT	1 mM
PMSF	0,6 mM

Aprotinin	10 µg/ml
Leupeptin	10 µg/ml

Der Puffer C wurde ohne PMSF, Aprotinin und Leupeptin angesetzt und gelagert. Diese Substanzen wurden bei Verwendung frisch zugegeben.

4.1.8.8 Westernblot

Trenngelpuffer

Tris HCl pH 8,8	1,5 M
SDS	0,4% (w/v)

Sammelgelpuffer

Tris HCl pH 6,8	0,5 M
SDS	0,4% (w/v)

Laufpuffer

Tris HCl pH 6,8	25 mM
Glycin	200 mM
SDS	0,1% (w/v)

Transferpuffer

Laufpuffer	80% (v/v)
Methanol	20% (v/v)

Blockingpuffer

DPBS	
Magermilchpulver	5% (w/v)

Waschpuffer

DPBS	
Tween 20	0,5% (v/v)

PBS

NaCl	140 mM
KCl	25 mM

MgCl ₂	0,5 mM
CaCl ₂	1 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM

4.1.8.9 EMSA

10x TBE-Puffer

Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM

10x AP-1 EMSA Mix

HEPES, pH 7,9 (mit KOH eingestellt)	150 mM
KCl	100 mM
MgCl ₂	20 mM
DTT	2,5 mM
BSA	2 mg/ml

AP-1 Bindepuffer

HEPES, pH 7,9 (mit KOH eingestellt)	20 mM
Glycerol	20% (v/v)
KCl	100 mM
EDTA	0,2 mM
PMSF	0,2 mM
DTT	1 mM

Der Bindepuffer wurde ohne PMSF und DTT angesetzt und gelagert. Beide Substanzen wurden bei Verwendung frisch zugegeben.

Blaumarker

Glycerol	50%
EDTA	50 mM
Bromphenolblau	0,2 g/l

TE-Puffer

Tris HCL pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

TEN50

Tris HCL pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM
NaCl	50 mM

4.1.8.10 Gelelektrophorese von Agarosegelen**10x TAE-Puffer**

Tris/HCl	2 M
Natriumacetat	250 mM
EDTA	500 mM

4.1.9 Radionukleotide

[γ - ³² P]-ATP	Perkin Elmer, Rodgau
-----------------------------------	----------------------

4.1.10 Sonstige Reagenzien

1 kb Plus DNA Ladder	Fisher Scientific, Schwerte
3-Mercapto-1,2-propandiol	Sigma-Aldrich, Steinheim
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Applichem, Darmstadt
BSA für Restriktionsverdau	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Bradford Dye Reagent	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Chloroform	VWR, Darmstadt
Dinatriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt

Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
dNTPs	PeqLab, Erlangen
EasyMag Lysepuffer	bioMérieux, Nürtingen
EasyMag Extraktionspuffer 1	bioMérieux, Nürtingen
EasyMag Extraktionspuffer 2	bioMérieux, Nürtingen
EasyMag Extraktionspuffer 3	bioMérieux, Nürtingen
EasyMag Magnetsilika	bioMérieux, Nürtingen
Entwickler	Tetenal Europe, Norderstedt
Ethanol vergällt	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Gibco, Karlsruhe
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure (EGTA)	Gibco, Karlsruhe
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg
Fixierer	AGFA, Mortsels, Belgien
Glycerol	Serva, Heidelberg
Glycin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Igepal	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
Kollagenase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Steinheim
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	Serva, Heidelberg
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Methanol	Fisher Chemical, Schwerte
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Caelo, Hilden
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg

Neutralrot	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly-dIdC	Sigma-Aldrich, Steinheim
Prestained Protein Marker	Scientific, Braunschweig
Qiazol	Qiagen, Hilden
Ribolock RNase Inhibitor	Thermo Scientific, Braunschweig
Rotiphorese Gel 30 Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel A 30% Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel B 2% Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Salmon Sperm DNA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
SeaPlaque Agarose	FMC, Rockland, ME, USA
SeaKem LE Agarose	Lonza, Köln
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Applichem, Darmstadt
Vectashield <i>Mounting Medium</i>	Vector, Burlingame, CA, USA

4.1.11 Sonstige Materialien

MACS Säulen	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
MACS Multistand	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
MACS Seperator	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Neubauer-Zählkammer	NeoLab, Heidelberg
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare, Solingen
Röntgenfilme Super RX-N	Fujifilm
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellsiebe	BD Biosciences, Heidelberg

Sonstige Verbrauchsmaterialien wurden von Braun (Melsungen), Greiner (Frickhausen), Sarstedt (Nümbrecht) und VWR (Darmstadt) bezogen.

4.1.12 Geräte

ChemiDoc XRS+	BioRAD, München
EMSA Gelkammer	Whatman, Maidstone, UK

FACSCantoll	BD Biosciences, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop DMI6000 B	Leica, Wetzlar
LightCycler 480	Roche Diagnostics, Mannheim
Megafuge 1.0R; Rotor BS4402/A und Plattenrotor #2704	Heraeus, Hanau
NANODROP 2000c	peQLab Biotechnologie, Erlangen
nucliSENS® easyMAG	bioMérieux, Nürtingen
SDS-PAGE Gelkammer	Biometra, Göttingen
Sonifier 250 Ultraschallgerät	Branson Ultrasonic, Danbury, USA
Ultraspec 3000 Photometer	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
VICTOR X4 <i>Multilabel Plate Reader</i>	Perkin-Elmer, Überlingen
Westernblot-Kammer	Biorad, München
Zentrifuge 1-15PR; Rotor 12132-H	Sigma, Osterode am Harz

4.1.13 Software

ALGGEN – PROMO (TRANSFAC Version 8.3)	alggen.lsi.upc.es
Citavi 6	
Chromas Lite	
ClustalW Multiple Sequence Alignment	http://genome.jp/tools/clustalw/
FACSDIVA	
GraphPad Prism 7	
ImageJ	
Leica Application Suite V3.6	
Microsoft Office 2016	
NCBI BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Quantity One	
Reverse Complement	http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

4.2.1.1 Isolation von kortikalen Nierenzellen aus Nierengewebe

Zur Zellisolation wurden etwa 1 cm³ große Gewebestücke zuerst in einer Petrischale mit einem Skalpell in etwa 10 gleichgroße Stücke geschnitten, anschließend mit Kollagenase-Lösung bedeckt und für eine Stunde bei gelegentlichem Schwenken im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde nach der Inkubation in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 1400 rpm in der Megafuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, verworfen und die Zellen in DPBS resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde anschließend noch zweimal wiederholt.

Nach dem Waschen wurden die Zellen in 10 ml Trypsin/EDTA Lösung resuspendiert und erneut in eine Petrischale überführt. Darauf folgte eine weitere Inkubation für etwa 30 min bei 37°C im Brutschrank bei gelegentlichen Schwenken. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zum Stoppen der Trypsin-Reaktion wurden 10 ml 1x DPBS mit 10% FKS zugegeben. Die Zellen wurden zum Ausschluss von unverdauten Geweberesten einmal mit DPBS gewaschen und anschließend nacheinander durch ein Zellsieb mit 100 µm, 70 µm und 40 µm Maschenweite in jeweils frische 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde anschließend abzentrifugiert, das Pellet in 10 ml RPMI-Medium mit Zusätzen aufgenommen und in eine 10 cm² Zellkulturschale überführt. Die Zellen wurden anschließend im Brutschrank bei 37°C bis zu einer Konfluenz von etwa 80% kultiviert. Das Medium wurde nach drei Tagen gewechselt.

4.2.1.2 Isolation von Epithelzellen der proximalen Nierentubuli

Die Isolation der Epithelzellen der proximalen Nierentubuli (RPTEC) erfolgte über immunomagnetische Trennung (Baer et al., 1997). Dazu wurden die zuvor isolierten kortikalen Nierenzellen mit Hilfe von Trypsin/EDTA Lösung vom Boden der Zellkulturschalen abgelöst und die Trypsin-Reaktion durch Zugabe der zehnfachen Menge RPMI-Medium mit Zusätzen abgestoppt. Zur Entfernung des Trypsins wurden die Zellen einmal mit DPBS gewaschen und in frischem Medium aufgenommen. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe der Neubauerzählkammer (siehe Abschnitt 4.2.1.6). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurde der Überstand des Zellpellets abgekippt und 5 µg des CD13-Antikörpers für 10⁷ Zellen in den Rückfluss gegeben. Bei geringeren oder höheren Zellzahlen wurde die Menge des Antikörpers entsprechend angepasst. Die Zellen

wurden im Rückfluss resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden ebenfalls auf Eis durchgeführt.

Nach der Inkubation wurden 2 ml Waschpuffer zugegeben und die Zellen abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt und der Überstand nach dem letzten Schritt komplett abgenommen. Das Zellpellet wurde anschließend in 80 µl Waschpuffer aufgenommen und 20 µl der anti-IgG Microbeads wurden zugegeben. Zur Bindung der Microbeads erfolgte eine Inkubation für 15 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Waschpuffer gewaschen und in 500 µl frischem Waschpuffer aufgenommen. Die Trennung der markierten RPTEC erfolgte mit Hilfe der MACS-Säulen. Diese wurden an einem Magnet (MACS-Separator) befestigt und dieser an den Magnetständer (MACS-Multistand) angeheftet. Unter der Säule wurde ein frisches 50 ml Zentrifugenröhrchen platziert. Bevor die Zellen auf die Säule gegeben wurden, fand eine Vorbehandlung der Säule mit 500 µl Waschpuffer statt. Die Zellsuspension wurde anschließend vollständig auf die Säule pipettiert und der Durchfluss aufgefangen. Dieser wurde weitere zweimal auf die Säule gegeben und jeweils in einem frischen Röhrchen aufgefangen.

Zur Elution der gebundenen Zellen wurden 40 ml DPBS in einem frischen Zentrifugenröhrchen vorgelegt, die Säule aus dem Magnetfeld genommen und 1 ml frischer Waschpuffer auf die Säule gegeben. Dieser wurde mit Hilfe des der Säule mitgelieferten Stempels durch die Säule gedrückt, wodurch die gebundenen Zellen vom Säulenmaterial gespült wurden. Diese Zellsuspension wurde abzentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen in RPTEC Kultivierungsmedium aufgenommen und gezählt. Die Zellen wurden anschließend in einer Dichte von etwa 10^6 Zellen pro Flasche ausgesät oder in Einfriermedium eingefroren (siehe 4.2.1.7).

4.2.1.3 Auftauen von Zellen

Die Kryoröhrchen mit den eingefrorenen Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff genommen, in der Hand zügig aufgetaut und nach dem Auftauen sofort in eine frische Zellkulturflasche mit vorgelegtem Medium überführt. Ein Mediumwechsel zum Entfernen des DMSO erfolgte unmittelbar nach dem Anwachsen der Zellen (nach etwa 6-8 Stunden), spätestens nach 24 Stunden.

4.2.1.4 Kultivierung von 293TT Zellen

293TT Zellen wurden in 75 cm² Flaschen kultiviert. Zur Stammhaltung erfolgte die Passagierung der Zellen nach jeweils 3-4 Tagen. Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen einmal mit 10 ml DPBS und zweimal mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung durch leichtes Schwenken der Flasche gewaschen. Anschließend wurden 0,5 ml frische Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben und für etwa 5 min im Brutschrank inkubiert. Zum Abstoppen der Trypsin-Reaktion wurden 9,5 ml frisches

Medium zugegeben. 19 ml frisches Medium wurden in einer frischen 75 cm² Zellkulturflasche vorgelegt und 1 ml der Zellsuspension wurde in die Flasche gegeben. Hygromycin B wurde anschließend frisch in jede Flasche gegeben.

4.2.1.5 Kultivierung von RPTEC

Die Kultivierung von RPTEC erfolgte in 150 cm² Zellkulturflaschen. Die Passagierung der Zellen erfolgte etwa einmal pro Woche (bei ca. 70-80% Konfluenz). Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen durch leichtes Schwenken einmal mit 10 ml DPBS und zweimal mit 5 ml Trypsin/EDTA gewaschen und anschließend wurde 1 ml Trypsin/EDTA zugegeben. Nach einer Inkubation von etwa 5 min im Brutschrank wurde die Reaktion mit 9 ml Medium gestoppt, die Zellen abzentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen. Etwa 10⁶ Zellen wurden in 25 ml Medium in eine frische Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank inkubiert.

Nach der Isolation der RPTEC wurden diese bis Passage 10 passagiert und in verschiedenen Passagen eingefroren. Je nach Experiment wurden Zellen verschiedener Passagen aufgetaut und nach etwa einer Woche Wachstum direkt für die Versuche verwendet. Eine Passagierung der RPTEC war maximal bis Passage 12 möglich. Von jeder eingefrorenen Passage wurden Tests auf Verunreinigung durch Mykoplasmen durchgeführt.

4.2.1.6 Zellzahlbestimmung

50 µl der Zellsuspension wurden mit dem gleichen Volumen Trypanblau versetzt und auf eine Neubauerzählkammer aufgetragen. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen in den vier großen Quadraten gezählt und die Berechnung der Zellzahl pro ml fand mit nachfolgender Formel statt:

$$\frac{\text{Gesamtzellzahl}}{2} * 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

4.2.1.7 Einfrieren von RPTEC

RPTEC wurden in einer Zellzahl von 1-2 x 10⁶ Zellen pro ml eingefroren. Dazu wurden die Zellen abgelöst, gezählt und im entsprechenden Volumen vorgekühlten Einfriermediums aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Kryoröhrchen (je 1 ml pro Röhrchen) verteilt und sofort auf Eis gestellt. Zum Einfrieren der Zellen wurden die Röhrchen zuerst für mindestens 24 h bei -80°C gelagert und anschließend zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

4.2.1.8 PCR zum Mykoplasmen-Nachweis

Überstände von RPTEC, die für ca. eine Woche nach dem Auftauen oder der Passagierung in einer 150 cm² Flasche gewachsen waren wurden gesammelt und DNA wurde mit Hilfe des QiAmp

Mini Kits nach den Vorgaben des Herstellers isoliert. Zur PCR wurde für jede Probe folgender Ansatz in je ein PCR-Röhrchen pipettiert:

8,3 µl	H ₂ O dest.
2,7 µl	10x Puffer/d’NTP Mix
10 µl	Primermix [0,5 µM]
1 µl	Interne Kontrolle
1 µl	Taq-Polymerase
2 µl	DNA
25 µl	Gesamtvolumen

Folgendes Programm wurde für die PCR Reaktion im PTC-200 Thermocycler verwendet:

Tabelle 5: Programm für die PCR zum Mykoplasmen-Nachweis.

Schritt	Vorgang	Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [s]
Denaturierung	-	1	94	60
	Denaturierung		94	30
Amplifikation	Annealing	35	62	30
	Elongation		72	30
-	-	1	72	180
Kühlen	-	1	20	-

Die PCR-Produkte wurden anschließend auf einem 3%igen Agarosegel aufgetrennt. Dazu wurden 12 g Agarose in 400 ml TAE-Puffer aufgekocht und nach 30-minütigem Abkühlen in eine Gelkammer mit Kamm gegossen. Dem Gel wurden im abgekühlten und flüssigen Zustand zur Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht Ethidiumbromid [625 ng/ml] zugegeben. Der Lauf des Gels erfolgte für etwa eine Stunde bei 100V und maximaler Stromstärke. Fotos des Gels wurden mit Hilfe des ChemiDoc aufgenommen.

4.2.1.9 Neutralrotest

Der Neutralrotest wurde zur Messung des Zellwachstums und der Zytotoxizität verschiedener Medikamente mit infizierten Zellen in 96-Well Platten durchgeführt. Dazu wurde das Medium der Zellen entfernt und pro Ansatz 100 µl Neutralrot-Lösung (50 µg/ml Neutralrot in Infektionsmedium) auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation für 2 Stunden im Brutschrank wurden die Zellen

zweimal mit DPBS gewaschen und anschließend 100 µl Citratpuffer zu jedem Ansatz gegeben. Zur Vermeidung von Kristallbildung wurde die Platte kurz geschwenkt und der gefärbte Puffer wurde in eine 96-Well Testplatte überführt. Die Messung der Absorption erfolgte mit Hilfe des Victor X4 bei einer Wellenlänge von 550 nm und einer Referenzwellenlänge von 405 nm.

4.2.2 Viren und Infektionen

4.2.2.1 Anzucht archetypischer BKPyV Stämme in 293TT Zellen

Zur Virusanzucht verschiedener archetypischer BKPyV-Stämme wurde hochtitriger Patientenurin (Viruslast $>10^9$ Kopien/ml), welcher von der diagnostischen Abteilung des Instituts für Virologie gesammelt und zur Verfügung gestellt wurde, verwendet. Dazu wurden je nach Viruslast 1-2 ml Urin mit dem gleichen Volumen DMEM (ohne Zusätze) gemischt. Anschließend wurde das Medium von 293TT Zellen (etwa 10-20% konfluent) abgenommen und durch die Urin-DMEM-Mischung ersetzt. Zur Infektion der Zellen erfolgte eine Inkubation für eine Stunde im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit jeweils 10 ml DPBS gewaschen und frisches Medium mit Hygromycin B wurde zugegeben. Einmal pro Woche wurde das Medium gewechselt und der infektiöse Überstand in 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Für zellfreie Virusstocks wurden die Überstände für 5 min bei 2000 rpm in der Megafuge abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Röhrchen überführt, in 2 ml Schraubdeckelröhrchen aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Analyse der Sequenz der NCCR erfolgte wie in 4.2.3.2 beschrieben.

4.2.2.2 Produktion des Dunlop-Genoms in E. coli

Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C in LB Amp Medium kultiviert und die Plasmid-DNA mit Hilfe des NucleoBond® Xtra Maxi Kits nach den Vorgaben des Herstellers isoliert. Das Dunlop-Genom wurde mittels eines Restriktionsverdau aus dem Plasmid herausgeschnitten. Dazu wurde folgender Ansatz pipettiert:

Plasmid-DNA	2 µg
NEB Puffer 2.1	6 µl
10x BSA	6 µl
EcoRI	2 µl
H₂O	ad 40 µl

Anschließend erfolgte eine Inkubation für zwei Stunden bei 37°C und 20 min bei 65°C . Der Ansatz wurde danach auf einem 1% Agarosegel wie in 4.2.1.8 beschrieben gelelektrophoretisch aufgetrennt, die Bande des Dunlop-Genoms wurde unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA

mit Hilfe des NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits isoliert. Zur Ligation des Genoms wurde anschließend folgender Ansatz pipettiert:

Ligasepuffer	4 μl
T4 Ligase	2 μl
DNA	26 μl
H₂O	8 μl

Dieser Ansatz wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

4.2.2.3 Anzucht von Dunlop-BKPyV in 293TT Zellen

293TT-Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^4 Zellen pro Ansatz in eine 24-Well Platte ausgesät und am nächsten Tag mit 1 μ g des Dunlop-Genoms mit Hilfe von Lipofectamine 2000 transfiziert. Dazu wurde ein vom Hersteller vorgegebenes Protokoll verwendet. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA Verdau abgelöst und in je ein Loch einer 6-Well Platte überführt. Nach fünf Tagen wurden die dicht gewachsenen Zellen wieder abgelöst und komplett in einer 75 cm² Zellkulturflasche ausgesät. Nach einer Woche wurde das Medium gewechselt, der Überstand gesammelt und die Viruslast wie in 4.2.3.3 beschrieben mittels qRT-PCR bestimmt. Die Kultivierung der Zellen wurde mehrere Wochen fortgeführt, wobei ein wöchentlicher Wechsel des Mediums durchgeführt wurde. Für zellfreie Virusstocks wurden die gesammelten Überstände wie in Abschnitt 4.2.2.1 beschrieben abzentrifugiert und bei -80°C gelagert.

4.2.2.4 Infektion von RPTEC

Für die Infektion von RPTEC wurden, sofern nicht anders angegeben, Zellen in Passage 11 oder 12 verwendet. Die Zellzahlen und Volumina, die für die Infektionsversuche verwendet wurden, können Tabelle 6 entnommen werden. Die Zellen wurden im entsprechenden Format, wenn nicht anders angegeben, in BKIM ausgesät. Die Infektion erfolgte nach 24 Stunden. Dazu wurden die Viren der jeweiligen Stocks auf eine Multiplizität der Infektion (engl. *multiplicity of infection*, MOI; siehe 4.2.2.5) von 0,02 infektiösen Einheiten (IE) pro Zelle in DMEM ohne Zusätze verdünnt. Der Überstand der RPTEC wurde entfernt und die Virusverdünnung wurde auf die Zellen gegeben. Danach wurden die Platten in einem Plattenrotor in der Megafuge für eine Stunde bei Raumtemperatur und 1400 rpm zentrifugiert. Der Überstand der Zellen wurde anschließend abgenommen, verworfen und die Zellen wurden dreimal mit DPBS gewaschen (das Volumen entspricht „Volumen nach Infektion“ in Tabelle 6). Nach dem dritten Waschschrift wurde frisches

BKIM auf die Zellen gegeben und die Platten im Brutschrank bis zur weiteren Verwendung inkubiert.

Tabelle 6: Übersicht über Zellzahl und Volumina bei der Kultivierung und Infektion von RPTEC.

Format	RPTEC Zellzahl	Volumen bei Infektion	Volumen nach Infektion
6-Well	3×10^5	2 ml	5 ml
12-Well	1×10^5	1 ml	2 ml
24-Well	4×10^4	500 μ l	1 ml
96-Well	$1,5 \times 10^4$	100 μ l	200 μ l

4.2.2.5 *Fluorescent Focus Assay*

Zur Quantifizierung der in 293TT Zellen generierten Virusstocks wurde ein *Fluorescent Focus Assay* nach einem abgeänderten Protokoll von Moriyama und Sorokin (2009) durchgeführt. Sterile Deckgläschen mit einem Durchmesser vom 1 cm wurden mit einer Pinzette in die Löcher einer 24-Well Platte gelegt und RPTEC wurden entsprechend Tabelle 6 in diesen Löchern ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 5×10^7 und 10^8 Genomäquivalenten des WWM12 Stocks pro Well infiziert und für 5 Tage im Brutschrank inkubiert. Bei der Dunlop-Quantifizierung erfolgte die Infektion mit 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 und 10^7 GÄq/Well. Nach 5 Tagen wurde der Zellüberstand entfernt und 500 μ l eiskaltes Methanol auf die Zellen gegeben. Zur Fixierung der Zellen wurden die Platten anschließend für 10 min bei -20°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Methanol entfernt und die fixierten Zellen dreimal mit DPBS gewaschen. Danach wurden 500 μ l Blocking-Puffer zu jedem Ansatz gegeben und die Platte für 30 min auf einem Orbitalschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Der Puffer wurde anschließend verworfen und 200 μ l Färbepuffer wurden auf die Zellen gegeben. 2 μ l des primären TAg-Antikörpers wurden zu jedem Ansatz gegeben und es folgte eine Inkubation für eine Stunde auf dem Orbitalschüttler.

Anschließend wurde der Puffer entfernt und die Zellen wurden dreimal mit DPBS gewaschen. 200 μ l Färbepuffer und 1 μ l des FITC-markierten Sekundärantikörpers wurden danach auf die Zellen gegeben und wieder für weitere 30 min auf dem Schüttler inkubiert. Nach diesem Schritt wurde erneut dreimal mit DPBS gewaschen und pro Ansatz wurden 200 μ l eiskalte DAPI-Lösung (0,2 ng/ml in Methanol) zugegeben. Nach 2 min Inkubation auf dem Schüttler wurde die DAPI-Lösung entfernt und die Zellen wurden zweimal mit Methanol gewaschen. Nachdem zweiten Waschen wurde das Methanol verworfen und die Platte wurde zum Trocknen der Zellen für 5 min bei Raumtemperatur offen stehen lassen. Die getrockneten Deckgläschen mit den fixierten Zellen

wurden anschließend mit Hilfe einer Pinzette aus den Platten genommen und kopfüber auf ein Tropfen *Mounting Medium* auf einem Objektträger gestürzt. Die Objektträger wurden bis zur mikroskopischen Analyse dunkel bei 4°C gelagert.

Am Fluoreszenz-Mikroskop wurden Fotos der einzelnen Proben aufgenommen. Dabei wurden von jeder Probe jeweils die DAPI- und FITC-Färbung von fünf zufällig gewählten Bereichen des Deckgläschens aufgenommen und die jeweils positiven Zellen gezählt. Der Versuch wurde mit jedem Stamm dreimal durchgeführt und die *Fluorescence Forming Units* (FFU) wurden mit Hilfe folgender Parameter und Formeln berechnet. Im Folgenden werden die FFU durch die Bezeichnung „Infektiöse Einheiten“ (IE) ersetzt.

Benötigte Parameter:

Fläche pro Bildausschnitt: 0,59786 mm²

Wachstumsfläche pro Well: 186,265 mm²

Volumen der Infektion: 0,2 ml

Genomäquivalente pro ml der Infektion: (Genomäquivalente pro Well) x 5

Verwendete Formeln:

1. Berechnung infizierter Zellen (IE) pro Well:

$$\frac{\text{Mittelwert infizierter Zellen pro Bildausschnitt} * \text{Wachstumsfläche pro Well}}{\text{Fläche pro Bildausschnitt}}$$

2. Berechnung IE pro ml der Infektion:

$$\frac{\text{Infizierte Zellen pro Well}}{\text{Volumen der Infektion}}$$

3. Berechnung IE pro ml Stocklösung:

$$\frac{\text{IE pro ml der Infektion} * \text{Genomäquivalente pro ml Stocklösung}}{\text{Genomäquivalente pro ml der Infektion}}$$

4. Gesamtformel:

$$\frac{\text{Mittelwert infizierter Zellen pro Foto} * \text{Wachstumsfläche pro Well} * \text{Genomäquivalente pro ml Stocklösung}}{\text{Fläche pro Bildausschnitt} * \text{Volumen der Infektion} * \text{Genomäquivalente pro ml der Infektion}}$$

4.2.2.6 Medikamententests

Die Durchführung der Tests der verschiedenen Medikamente auf die Replikation des BKPyV kann dem Schema in Abbildung 8 entnommen werden. Die Messung aller Zeitpunkte und Konzentrationen erfolgte in Triplikaten.

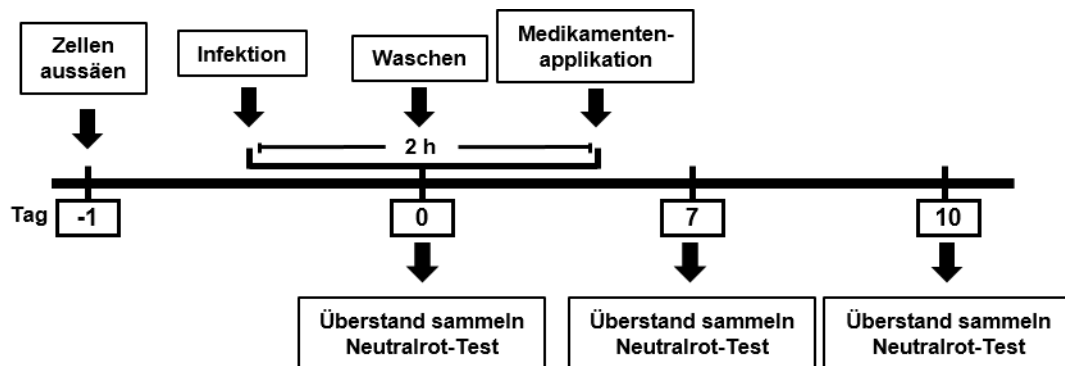


Abbildung 8: Zeitlicher Ablauf der Infektionsversuche für Medikamententests.

$1,5 \times 10^4$ RPTEC wurden in 96-Platten ausgesät und nach 24 Stunden, wie in Abschnitt 4.2.2.4 beschrieben, infiziert. Die Stocklösungen der unterschiedlichen getesteten Medikamente wurden in Infektionsmedium verdünnt und 200 μ l der Verdünnung wurden, sofern nicht anders angegeben, pro Ansatz nach dem dritten Waschschrift (etwa 2 Stunden nach Beginn der Infektion) auf die Zellen gegeben. 150 μ l der Überstände der infizierten Zellen wurden 7 und 10 Tage nach der Infektion zur Messung der Viruslast entnommen und 1:1 mit DPBS verdünnt. Mit den Zellen dieser Ansätze wurde zur Messung des relativen Zellwachstums ebenfalls ein Neutralrottest durchgeführt. Zur Generierung von Ausgangswerten für Viruslast und Zellwachstum wurden diese Parameter ebenfalls direkt nach der Infektion (Tag 0) gemessen.

4.2.2.7 Elektronenmikroskopie

RPTEC wurden entsprechend in einer 6-Well Platte ausgesät und mit dem WWM12-Stamm infiziert. Nach 21 Tagen wurde der Überstand abgenommen und die Zellen wurden einmal mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden 3 ml Fixans pro Well auf die Zellen gegeben und die Platten für zwei Stunden bei Raumtemperatur und sehr langsamem Schwenken auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Die Vorbereitung der Proben zur Ultradünnschnitt-Elektronenmikroskopie, sowie die Dokumentation erfolgte durch Lars Möller vom Robert Koch

Institut (Abteilung ZBS 4, Leitung Dr. Michael Laue) in Berlin. Die Aufnahmen wurden freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

4.2.2.8 Transformationsassay

Für die Durchführung des Transformationsassays wurden zwei verschiedene Agarose-Lösungen vorbereitet. 0,8 g SeaKem LE Agarose wurden in 25 ml destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert. Die durch das Autoklavieren verflüssigte Agaroselösung wurde entweder direkt verwendet oder nach dem Erhitzen im Kühlschrank gelagert und vor dem Gebrauch wieder in der Mikrowelle aufgekocht. 0,8 g SeaPlaque Agarose wurden ebenfalls in 25 ml destilliertem Wasser gelöst und autoklaviert. Durch ihren niedrigen Schmelzpunkt konnte diese Agarose bis zur Verwendung im flüssigen Zustand bei 37°C, oder erhärtet im Kühlschrank gelagert werden.

Zur Durchführung des Versuchs wurden 5 ml der flüssigen SeaKem LE Agaroselösung mit 5 ml auf 37°C vorgewärmtem Infektionsmedium vermischt und 1 ml dieser Mischung wurde zügig in jeweils ein Well einer 6-Well-Platte gegeben (1,28% Agarosekonzentration). Der Boden des Wells sollte dadurch komplett bedeckt sein. Zum Aushärten wurde die Platte 5 min in den Kühlschrank gestellt und anschließend wieder auf Raumtemperatur gebracht. RPTEC, die bereits eine Woche vor der Durchführung dieses Versuchs mit WWM12 infiziert oder als Kontrolle behandelt wurden, wurden abgelöst, gezählt und in 10 ml frischem Medium auf eine Konzentration von $1,15 \times 10^4$ Zellen pro ml eingestellt. Anschließend wurde diese Zellsuspension im Wasserbad auf 37°C erwärmt. 2,8 ml der flüssigen und ebenfalls 37°C warmen SeaPlaque Agaroselösung wurden der erwärmten Zellsuspension zugegeben (0,9% Agarosekonzentration), mit der Pipette gemischt und je 1 ml dieser Mischung wurde pro Well zügig auf die erhärtete Agarose/Medium-Schicht pipettiert. Zum Aushärten der oberen Schicht wurde die Platte wieder für 5 min in den Kühlschrank gestellt und 1 ml Medium wurde pro Well auf die oberste Schicht gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Platte für 21 Tage bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank. Nach einer Woche wurde den Ansätzen jeweils 1 ml frisches Medium zugegeben.

Zur Färbung der Zellen wurde eine 0,005%ige Kristallviolettlösung in DPBS angesetzt. Kristalle wurden mit Hilfe eines Sterilfilters herausgefiltert und je 1 ml dieser Lösung wurde in jedes Well pipettiert. Nach einer zweistündigen Inkubation der Platte im Brutschrank sollten blaue Kolonien transformierter Zellen makroskopisch sichtbar sein und Fotos jedes Wells wurden aufgenommen. Als Positivkontrolle dieses Versuchs wurde die transformierte 293TT-Zelllinie verwendet.

4.2.3 Weitere RNA/DNA-Methoden

4.2.3.1 Isolation viraler DNA

Zur Isolation von viraler DNA aus Zellkulturüberständen wurde der nucliSENS easyMAG nach einer in der diagnostischen Abteilung etablierten Standardvorgehensweise (SOP) mit den Reagenzien des Herstellers verwendet. Dazu wurden je 200 µl der Überstände in die Probestreifen pipettiert. Die Zugabe des Lysepuffers erfolgte durch das Gerät. Anschließend wurden die Ansätze mit einer Mehrkanalpipette gemischt und für 10 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden 50 µl der Silika zu jeder Probe gegeben und wieder mit der Mehrkanalpipette gemischt. Die weitere Isolation der DNA erfolgte automatisiert durch das Gerät. Die in Extraktionspuffer 3 eluierte DNA (je 70 µl) wurde nach dem Programm aus den Probestreifen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Die Langzeitlagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

4.2.3.2 *Nested* PCR zur Genotypisierung von BKPyV Stämmen

Zur Amplifikation der NCCR wurde eine *Nested* PCR durchgeführt (Gosert et al., 2008). Diese besteht im Gegensatz zur normalen PCR aus zwei einzelnen PCRs, wobei das PCR-Produkt der ersten PCR (äußere PCR) wieder in der zweiten (innere PCR) eingesetzt wird. Die Primer der äußeren PCR werden dabei so gewählt, dass sie die Primer der inneren PCR direkt umschließen. Dadurch wird die Spezifität der zweiten PCR-Reaktion stark erhöht. Die PCR wurde mit Hilfe des LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I Kits durchgeführt. Folgender Ansatz wurde für die äußere PCR pipettiert:

9 µl	H ₂ O dest.
4 µl	LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I Mix
1 µl	BKTT5 Primer [10 µM]
1 µl	BKTT6 Primer [10 µM]
5 µl	virale DNA
20 µl	Gesamtvolumen

Folgendes Programm wurde am LightCycler für die PCR verwendet:

Tabelle 7: PCR-Programm zur Durchführung der Nested PCRs.

Schritt	Vorgang	Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Temperaturänderung [°C/s]
Denaturierung	-	1	95	600	4,4
	Denaturierung		95	10	4,4
Amplifikation	Annealing	45	55	10	2,2
	Elongation		72	20	4,4
Schmelzkurve	Denaturierung		95	5	4,4
	Annealing	1	40	60	2,2
	Schmelzen		95	/	0,11
Kühlen	-	1	37	10	2,2

Nach der äußeren PCR wurde das PCR-Produkt aus der Platte in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 1:5000 mit destilliertem Wasser verdünnt. Folgender Ansatz wurde für die innere PCR pipettiert:

13 µl	H ₂ O dest.
4 µl	LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I Mix
1 µl	BKTT7 Primer [10 µM]
1 µl	BKTT8 Primer [10 µM]
1 µl	PCR-Produkt innere PCR (1:5000 verdünnt)
20 µl	Gesamtvolumen

Die PCR wurde mit dem gleichen Programm der äußeren PCR durchgeführt. Das PCR-Produkt der inneren PCR wurde anschließend wieder in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C gelagert. Die Aufreinigung und Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte durch die Firma Seq-It (Kaiserslautern).

4.2.3.3 Quantitative real-time PCR zur Viruslastbestimmung

Die Bestimmung der Viruslast erfolgte mit Hilfe des LightCycler FastStart DNA MasterPLUS Hybprobe Kits und wurde nach einer SOP der diagnostischen Abteilung durchgeführt. Dazu wurde eine Hydrolyse-Sonde verwendet. Dabei handelt es sich um ein Oligonukleotid, das sowohl mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluoreszein), als auch einem Stoff, der die Fluoreszenz des Farbstoffes hemmt (*Quecher*, Tetramethylrhodamin), markiert wurde. Im normalen Zustand wird

die Fluoreszenz durch die räumliche Nähe der beiden Stoffe und den dadurch entstehenden Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer unterdrückt. Die Sequenz der Sonde wird so gewählt, dass sie während der Annealing-Phase des PCR-Zyklus im PCR-Fragment binden kann. In der anschließenden Elongationsphase wird sie durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase zerstört, wodurch beide Stoffe freigesetzt werden und das Fluoreszenz bei entsprechender Anregung Fluoreszenz emittieren kann. Die gemessene Intensität ist somit proportional zur Menge des PCR-Produkts.

Folgender Ansatz wurde für diese PCR pipettiert:

4 µl	H ₂ O dest.
4 µl	LightCycler FastStart DNA MasterPLUS Hybprobe Mix
4 µl	Primer-Sonden-Mix
8 µl	virale DNA
20 µl	Gesamtvolumen

Folgendes Programm wurde am LightCycler für die PCR verwendet:

Tabelle 8: PCR-Programm zur Durchführung der quantitativen PCR zur Viruslastbestimmung.

Schritt	Vorgang	Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Temperaturänderung [°C/s]
Denaturierung	-	1	95	900	4,4
Amplifikation	Denaturierung	50	95	15	4,4
	Annealing +		61	25	2,2
	Elongation				
Kühlen	-	1	40	30	2,2

Zur Quantifizierung wurde zusätzlich ein in der diagnostischen Abteilung etabliertes Standard-Plasmid bei jeder PCR mitgeführt.

4.2.3.4 RNA-Isolation

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Aufreinigung durchgeführt. Der Überstand von RPTec in 12-Well Platten wurde entfernt und die Zellen wurden einmal mit DBPS gewaschen. Anschließend wurden 500 µl Trypsin/EDTA Lösung auf die Zellen gegeben. Nach einer etwa 5-minütigen Inkubation im Brutschrank wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl Infektionsmedium gestoppt und die

Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 5 min und 1600 rpm in der Sigma-Zentrifuge bei 4°C und der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 400 µl Qiazol resuspendiert und für 15 sec gevortext. Anschließend wurden 80 µl Chloroform dazugegeben, das Gemisch wieder für 15 sec gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Trennung der Phasen erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 14000 rpm und 4°C. Die obere, farblose Phase wurde vorsichtig entnommen und in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die weitere RNA-Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des miRNA-Kits (Macherey & Nagel). Dazu wurden zu jeder Probe 500 µl des Puffers MX gegeben und mit der Pipette gut gemischt. Dieses Gemisch wurde anschließend auf eine grüne oder blaue Säule in einem 2 ml Auffangröhrchen gegeben und zur DNA-Bindung für 1 min bei 11000 g zentrifugiert. Der Durchfluss der Säule wurde verworfen, es wurden 600 µl des Puffers MW1 auf die Säule gegeben und die Zentrifugation wiederholt. Nachdem der Durchfluss erneut verworfen wurde, wurden 700 µl des Puffers MW2 auf die Säule gegeben und wieder abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit einem frischen Auffangröhrchen, 250 µl desselben Puffers und einer 2-minütigen Zentrifugation wiederholt, bevor die Säule in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß eingesetzt wurde und 30 µl destilliertes und RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben wurden. Zur Elution der RNA wurde die Säule anschließend für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und wieder für 1 min bei 11000 g abzentrifugiert. Die RNA befand sich dann im Durchfluss und wurde bei -80°C gelagert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch am NanoDrop gemessen.

4.2.3.5 cDNA-Synthese aus mRNA

Die cDNA-Synthese aus mRNA erfolgte mit Hilfe von zufälligen Hexamer-Primern. Dadurch wurde sichergestellt, dass alle möglichen mRNA-Transkripte umgeschrieben werden können. Für jeden Ansatz wurden 500 ng RNA eingesetzt. Folgender Ansatz wurde dafür pipettiert:

1 µl	Random Hexamer-Primer [500 µM]
1 µl	d’NTPs [10 mM]
500 ng	RNA
ad 15,2 µl	RNase-freies Wasser

Dieser Ansatz wurde für 5 min bei 65°C im Heizblock inkubiert, abzentrifugiert und folgende Komponenten wurden dazugegeben:

4 µl	Puffer
0,5 µl	Ribolock RNase-Inhibitor
0,3 µl	Maxima Reverse Transcriptase

Der komplette Ansatz wurde wieder kurz abzentrifugiert, 10 min bei Raumtemperatur und anschließend 30 min bei 50°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion folgte eine Inkubation für 5 min bei 95°C. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C. Zur PCR wurde eine 1:10 Verdünnung der cDNA eingesetzt.

4.2.3.6 Quantitative PCR mit cDNA

Zur Messung der Genexpression wurde mit der aus mRNA synthetisierten cDNA eine qRT-PCR durchgeführt. Die Primer wurden so gewählt, dass das PCR-Produkt mindestens ein Intron des betreffenden Gens überspannt oder auf den Exon/Intron-Übergang liegt. Dadurch wird gewährleistet, dass nur aus gespleißter mRNA synthetisierte cDNA als Templat dienen kann. Eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine Kontamination der RNA-Proben mit genomischer DNA kann somit ausgeschlossen werden. Folgender Ansatz wurde für jede PCR-Probe pipettiert:

3-7 µM	MgCl ₂
2 µl	10x Puffer
2 µl	TE-SS [40 ng/µl]
1 µl	DMSO
1 µl	Tween-20 [10%]
0,5 µl	BSA [20 ng/µl]
0,4 µl	d’NTPs [10 mM]
0,4 µl	UPL Sonde
0,5 µl	Primer sense [10 µM]
0,5 µl	Primer antisense [10 µM]
0,1 µl	Taq-Polymerase [5 U/µl]
ad. 15 µl	H₂O dest.
5 µl	cDNA
20 µl	Gesamtvolumen

Folgendes Programm wurde am LightCycler für die PCR verwendet:

Tabelle 9: PCR-Programm der quantitativen PCR zur Messung der Genexpression.

Schritt	Vorgang	Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Temperaturänderung [°C/s]
Denaturierung	-	1	95	600	4,4
	Denaturierung		95	5	4,4
Touchdown	Annealing	10	65	5	2,2
	Elongation		62	10	2,2
Amplifikation	Denaturierung		95	15	4,4
	Annealing	45	55	30	2,2
	Elongation		62	30	4,4
Kühlen	-	1	37	10	2,2

Zur Analyse der Genexpression der gemessenen Gene wurde eine relative Quantifizierung der vom Programm ausgegebenen *cycle threshold* Werte (CT-Werte) mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode durchgeführt (Livak und Schmittgen, 2001). Der vom Gerät bestimmte CT-Wert beschreibt den Zyklus, bei dem die Fluoreszenz und damit die DNA-Menge der Probe in die exponentiell wachsende Phase übergehen. Kleine CT-Werte stehen für eine hohe Menge an Ausgangs-DNA, große CT-Werte entsprechend für eine geringere DNA-Menge und damit auch für eine geringere Genexpression. Da in diesen Experimenten kein Standardplasmid verwendet wurde, war keine absolute Quantifizierung möglich. Durch die $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode können jedoch die Verhältnisse der Genexpressionen verschiedener Gene miteinander verglichen werden. Notwendig für diese Methode ist die Quantifizierung der Expression eines Haushaltsgens, also eines Gens dessen Expression unter allen getesteten Bedingungen (z.B. in infizierten und nicht-infizierten Zellen) gleich ist. Für die Experimente dieser Arbeit wurde die Expression des RPL13A-Gens als Haushaltsgen gewählt. Bei der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode wird im ersten Schritt die Expression (der CT-Wert) des Zielgens auf den CT-Wert von RPL13A normiert. Der ΔCT -Wert wurde dabei wie folgt ausgerechnet:

$$\Delta CT = CT (\text{Zielgen}) - CT (\text{Haushaltsgen})$$

Im zweiten Schritt wurden die CT-Werte der Zielgene in behandelten oder mit dem BKPyV infizierten Zellen mit den CT-Werten dieser Gene in nicht-behandelten oder nicht-infizierten Kontrollen verglichen. Dazu wurde folgende Formel verwendet:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{Behandelte Probe}) - CT (\text{Kontrolle})$$

Relative Expressionswerte der einzelnen Zielgene ergaben sich mit folgender namensgebender Berechnung:

$$\text{Expressionsverhältnis beider Proben} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

4.2.4 Weitere Protein-Methoden

4.2.4.1 Durchflusszytometrie

RPTEC wurden in den Passagen 5 und 12 in einer 6-Well Platte ausgesät und nach 24 Stunden mittels Trypsin/EDTA-Verdau abgelöst. Dazu wurden sie einmal mit 2 ml kaltem DPBS gewaschen und es wurden 500 µl Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben. Nach etwa 5-minütiger Inkubation im Brutschrank wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl vorgekühltem Infektionsmedium abgestoppt und die Zellen in ein Durchflusszytometrie-Röhrchen überführt. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden in der Megafuge abzentrifugiert und einmal mit kaltem FACS-Puffer gewaschen. Nach dem Waschen wurde der Überstand komplett abgenommen und 200 µl frischer FACS-Puffer zugegeben. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Mischen mit der Pipette vereinzelt und der CD13-Antikörper wurde zugegeben. Als Negativkontrolle wurden Proben mitgeführt, die mit einem Kontrollantikörper desselben Isotyps inkubiert wurden. Anschließend wurden die Röhrchen für eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde 1 ml FACS-Puffer zugegeben und die Zellen abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und es folgten zwei weitere Waschschrte mit jeweils 1 ml FACS-Puffer. Nach dem letzten Waschschrte wurde der Überstand wieder komplett abgenommen und die Zellen in 200 µl frischem FACS-Puffer gut resuspendiert. Dann wurde der AlexaFluor488 markierte Sekundärantikörper zugegeben und die Zellen wurden für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde erneut 1 ml FACS-Puffer zugegeben und die Zellen wie bereits beschrieben abzentrifugiert und gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurden 500 µl frischer FACS-Puffer zugegeben, die Zellen gut resuspendiert und die Proben direkt am FACSCanto II gemessen. Für eine spätere Messung konnten die Zellen wahlweise im letzten Schritt statt in FACS-Puffer in FACS-Fix aufgenommen werden und bis zur Messung dunkel bei 4°C gelagert werden (maximal 24 Stunden).

4.2.4.2 Immunfluoreszenz

Zum Nachweis der Expression der γ -Glutamyl-Transpeptidase 1 (GGT1) in RPTEC wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt. Dazu wurden RPTEC der Passagen 5 oder 12 wie

bereits in Abschnitt 4.2.2.4 beschrieben auf Deckgläschen ausgesät und einen Tag später, wie in Abschnitt 4.2.2.5 beschrieben, gefärbt. Sowohl der primäre GGT1-Antikörper, als auch der sekundäre FITC-markierte Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden Zellen, die nur mit dem Sekundärantikörper und nicht mit dem Primärantikörper inkubiert wurden, verwendet. Analysiert und fotografiert wurden die gefärbten Zellen anschließend am Fluoreszenzmikroskop.

Zur Färbung des TAg und VP1 in infizierten RPTEC wurden die Zellen ebenso ausgesät, entsprechend Abschnitt 4.2.2.4 infiziert und nach dem gleichen Protokoll drei Tage, sieben Tage und 10 Tage nach der Infektion gefärbt. Als Sekundärantikörper wurde ein AlexaFluor488-gekoppelter Antikörper gegen Maus-IgG bzw. ein AlexaFluor546-gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen-IgG verwendet. Die Verdünnungen können Tabelle 2 entnommen werden. Die Analyse erfolgte ebenfalls am Fluoreszenzmikroskop.

4.2.4.3 Proteinextraktion

Für Westernblot-Analysen wurden Proteinextrakte aus kompletten Zellen (Ganzzell-Extrakte) hergestellt. RPTEC wurden in 6-Well-Platten ausgesät und infiziert. Zu den gewünschten Zeitpunkten wurden die Zellen wie bereits beschrieben mittels Trypsin/EDTA-Verdau abgelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und einmal mit DPBS gewaschen. Nach dem Waschen wurde der Überstand komplett abgenommen und die Zellen in 50 µl Probenpuffer aufgenommen. Nach 10-sekündigem Vortexen wurden die Zellen mit Hilfe des Ultraschallgeräts auf Eis dreimal für 10 sec beschallt. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 95°C aufgeköcht und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

4.2.4.4 Proteinbestimmung

Die Ganzzell-Proteinextrakte wurden mit 1 M Natronlauge 1:100 verdünnt (5 µl auf 500 µl NaOH) und die Absorption wurde am Photometer bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde daraus mit folgender Formel annäherungsweise berechnet:

$$\frac{\text{Gemessene optische Dichte (OD)}}{3,2} = \text{Volumen in } \mu\text{l für 15 } \mu\text{g Protein}$$

4.2.4.5 Extraktion von Kernproteinen

Zur Durchführung von EMSA wurden Proteinextrakte aus Zellkernen verwendet. Diese haben im Vergleich zu Ganzzell-Extrakten den Vorteil, dass zytosolische Proteine oder Proteine aus anderen Zellkompartimenten ausgeschlossen werden und die gewünschten Kernproteine in höherer Konzentration in den Extrakten vorliegen. Zur Kernextraktion wurde ein modifiziertes

Protokoll nach Schreiber et al. (1989) verwendet. Dazu wurden RPTEC in 6 cm oder 10 cm Zellkulturschalen oder für Infektionen in 6-Well Platten ausgesät und je nach Experiment infiziert oder behandelt. In 6 cm oder 10 cm Schalen gewachsene Zellen wurden zur Kernextraktion einmal mit 5 ml (für 10 cm Schalen jeweils doppeltes Volumen) DPBS gewaschen und anschließend im gleichen Volumen DPBS mit Hilfe eines Zellschabers abgeschabt. Mit einer Pipette wurden die abgelösten Zellen in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, die Schale wieder mit 5 bzw. 10 ml DPBS gespült, die übrigen Zellen erneut abgeschabt und in das gleiche Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen in der Megafuge für 5 min bei 2600 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Das Pellet wurde in 200 bzw. 400 µl Puffer A aufgenommen, gut resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. In 6-Well Platten gewachsene und infizierte RPTEC wurden mittels Trypsin/EDTA-Verdau von der Platte gelöst und direkt in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 2600 rpm und 4°C in der Sigma-Zentrifuge wurde mit diesen Zellen ebenso wie mit den Zellen aus Zellkulturplatten verfahren. Für die Proben aus 6-Well Platten wurden die gleichen Volumina wie für Proben aus 6 cm Schalen verwendet.

Nachdem die Zellen in Puffer A aufgenommen wurden, wurden die Proben für 10 sec stark gevortext und anschließend für 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden 12,5 bzw. 25 µl 10% Igepal zugegeben und erneut für 10 sec gevortext. In der Sigma-Zentrifuge wurden die Proben anschließend für 1 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert und die Überstände abgenommen und verworfen. 25 bzw. 50 µl Puffer C wurden zugegeben und das Pellet wurde durch Pipettieren gut resuspendiert. Anschließend wurden die Proben auf einem Schüttler bei 1400 rpm und 4°C für mindestens zwei Stunden geschüttelt. Bei einer längeren Durchführung dieses Schrittes (bis zu 8 Stunden) konnten noch höhere Proteinkonzentrationen erreicht werden. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 14000 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand mit den Kernextrakten wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

4.2.4.6 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Messung der Proteinkonzentration der Kernextrakte wurde ein modifiziertes Protokoll nach Bradford (1976) verwendet. Dazu wurden 10 µl destilliertes Wasser in Löchern einer 96-Well Testplatte vorgelegt und je 2 µl der zu testenden Kernextrakte wurden zugegeben. Zur Erstellung einer Standardkurve wurden Proben mit je 1 µg, 2 µg, 4 µg, 6 µg und 10 µg BSA in Doppelbestimmung verwendet. Als Negativkontrolle wurden zwei Proben nur mit Wasser mitgeführt. Anschließend wurden zu jeder Probe 150 µl eines 1:5 in destilliertem Wasser verdünnten Färbekonzentrats (*Dye Reagent Concentrate*) gegeben und bei Raumtemperatur bis

zum Farbumschlag (etwa 10 min) inkubiert. Die Messung erfolgte am Victor X4 bei 625 nm und einer Referenz bei 405 nm. Mit Hilfe der Absorptionen der Standardkurve wurden die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben direkt vom Programm berechnet.

4.2.4.7 SDS-PAGE und Western Blot

SDS-PAGE

Zur Durchführung der SDS-PAGE wurden ausschließlich 10%ige SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Diese bestanden jeweils aus einem Trenngel und Sammelgel, die übereinander gegossen wurden. Zur Herstellung des Trenngels (10%) wurde folgender Ansatz in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert:

2 ml	Trenngelpuffer
2,65 ml	Acrylamid [30%]
1,08 ml	Bisacrylamid [2%]
2,29 ml	H₂O dest.
70 µl	APS [10%]
7 µl	TEMED

Das Röhrchen wurde geschwenkt und der Ansatz zwischen zwei vorbereitete Platten gegossen (bis etwa 70% der Höhe der kleinen Platte). Nach Erhärten des Trenngels wurde zur Herstellung des Sammelgels folgender Ansatz pipettiert und auf das Trenngel gegeben:

1,25 ml	Sammelgelpuffer
750 µl	Acrylamid [30%]
300 µl	Bisacrylamid [2%]
2,7 ml	H₂O dest.
50 µl	APS [10%]
10 µl	TEMED

Die Proteinextrakte wurden aufgetaut und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Das erhärtete Gel wurde in die Gelkammer gestellt und die Kammer mit Laufpuffer gefüllt. Anschließend wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde auf jedem Gel ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Der Lauf erfolgte für etwa 1-2 Stunden bei maximaler Spannung und 20 mA.

Westernblot

Nachdem der Marker bis zum unteren Rand des Gels gelaufen war, wurde die Elektrophorese gestoppt. Der Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran erfolgte mit Hilfe eines Tank-Blot-Systems. Dazu wurde das Gel auf die Nitrozellulosemembran gelegt, beide zusammen zwischen je einen Schwamm und eine Schicht Transfer-Filterpapier gelegt und in der Kammer fixiert. Die Kammer wurde anschließend mit Transferpuffer gefüllt. Die Übertragung der Proteine erfolgte für 90 min bei 200 V und 300 mA.

Blocken der Membran und Proteindetektion

Nach der Übertragung wurde die Membran in einem Schälchen in Blockingpuffer für 30 min auf einem Orbitalschüttler geblockt. Der Puffer wurde entfernt und der Primärantikörper wurde verdünnt in 5 ml frischem Blockingpuffer auf die Membran gegeben. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für eine Stunde oder über Nacht auf einem Orbitalschüttler bei 4°C. Anschließend wurde der Puffer entfernt und die Membran im selben Schälchen dreimal für je 10 min in Waschpuffer auf dem Orbitalschüttler bei Raumtemperatur gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde 1:5000 in 5 ml Blockingpuffer verdünnt, auf die Membran gegeben und für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran wieder dreimal mit Waschpuffer gewaschen und die Detektion der Proteine erfolgte am ChemiDoc. Dazu wurden beide Puffer des *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate* 1:1 in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt (für einen Blot je 100 µl) und das Gemisch auf die Membran getropft. Fotos der Lumineszenz wurden vom Gerät aufgenommen.

4.2.4.8 EMSA

Das Programm PROMO wurde verwendet, um potenzielle Bindestellen für AP-1 in der NCCR des WWM12 und Dunlop-Stamms zu identifizieren. Eine bereits veröffentlichte AP-1 Konsensussequenz wurde als Positivkontrolle verwendet (Lee et al., 1987; Oldak et al., 2010). Die *sense*- und *antisense*-Sequenzen der vorhergesagten Bindestellen wurden als Oligonukleotide bestellt und zu doppelsträngiger DNA zusammengefügt. Dafür wurden jeweils 20 µl beider Oligos jeder Bindestelle und 20 µl TEN50-Puffer gemischt, der Ansatz für 5 min im Heizblock bei 95°C inkubiert und zur Hybridisierung beider Stränge im ausgeschalteten Heizblock bis auf Raumtemperatur abkühlen lassen. Anschließend wurde die DNA-Konzentration am NanoDrop gemessen und mit destilliertem Wasser auf 12,5 ng/µl eingestellt. Zur Markierung mit radioaktivem ³²P wurden 25 ng dieser Ansätze mit 5 U der T4-Polynukleotidkinase (0,5 µl; PNK), 1 µl PNK-Puffer und 1 µl radioaktivem [γ³²P]-ATP gemischt und für eine Stunde bei 37°C im Heizblock inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion folgte eine Inkubation für 10 min bei 70°C. Der Heizblock wurde ausgeschaltet und die Ansätze wurden darin langsam auf Raumtemperatur

abgekühlt. Anschließend wurden sie 1:10 mit TE-Puffer verdünnt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Zur Herstellung des Polyacrylamidgels für die Auftrennung der Proben wurde folgender Ansatz pipettiert und zwischen zwei Gelplatten gegossen:

50 ml	H ₂ O
1,5 ml	TBE-Puffer [10x]
8 ml	Acrylamid [30%]/Bisacrylamid [0,8%]
540 µl	APS
42 µl	TEMED

Die Proben zur Auftrennung auf dem Gel wurden folgendermaßen angesetzt:

2 µl	AP-1 EMSA-Mix [10x]
10 µl	AP-1 Bindepuffer
5 µg	Kernextrakt
1 µl	Poly(dI-dC)
ad. 19 µl	dest. H₂O
1 µl	Oligo
20 µl	Gesamtvolumen

Vor der Zugabe der radioaktiv-markierten Oligos wurde der Ansatz für 10 min und nach der Zugabe der Oligos für weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für *in vitro* Kompetitionen mit Bexaroten (Endkonzentration 20 µM) und Fenretinid (Endkonzentration 10 µM) wurde dem Ansatz vor der Zugabe der radioaktiv markierten Bindestelle 1 µl der vorbereiteten Stocklösung des Medikaments zugegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. DMSO wurde als Kontrolle verwendet. Ebenso wurde mit den Antikörpern bei *Supershift*-Analysen verfahren. Das H₂O-Volumen dieser Ansätze wurde entsprechend reduziert. Nach der Inkubation wurden mindestens einer Probe zur Sichtbarmachung der Lauffront 10 µl Blaumarker zugegeben und die Proben wurden auf das Gel geladen. Der Lauf erfolgte für etwa 60 min bei maximaler Stromstärke und 180 V. Anschließend wurde das Gel auf Transfer-Filterpapier gelegt und für mindestens zwei Stunden auf dem Vakuumtrockner getrocknet. Die Detektion der radioaktiven Banden erfolgte durch Exposition von Röntgenfilmen mit dem getrockneten Gel bei -80°C. Die Röntgenfilme wurden anschließend entwickelt und zur Auswertung digitalisiert.

4.2.5 Statistische Auswertung

Die Experimente dieser Arbeit wurden, wenn nicht anders angegeben, mindestens dreimal und sofern möglich in Triplikaten durchgeführt und die Ergebnisse zusammengefasst. Zur statistischen Auswertung einiger Experimente wurde ein doppelseitiger und ungepaarter t-Test mit Hilfe des Programms GraphPad 7 durchgeführt. Als signifikant wurden durch den t-Test berechnete p-Werte $<0,05$ angesehen.

5 Ergebnisse

5.1 Isolierte RPTEC exprimieren spezifische Marker

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurden RPTEC von zwei Spendern isoliert und deren Identität mit Hilfe der RPTEC-spezifischen Marker GGT1 und CD13 kontrolliert. Zur Etablierung der RPTEC als Replikationssystem für archetypische BKPyV-Stämme wurden von beiden Spendern sowohl RPTEC der Passage 5, als auch der Passage 12 verwendet. Deshalb wurde in diesem Experiment zusätzlich die Stabilität der Marker in diesen Passagen evaluiert. Der Nachweis des intrazellulären RPTEC-Markers GGT1, der im proximalen Nierenepithel und nicht in anderen Zellpopulationen des Nierenkortex exprimiert wird, erfolgte mittels Immunfluoreszenz. In den Zellen beider Spender konnte sowohl in RPTEC der Passage 5 (Abbildung 9A und C), als auch der Passage 12 (Abbildung 9B und D) eine deutliche GGT1-Expression nachgewiesen werden.

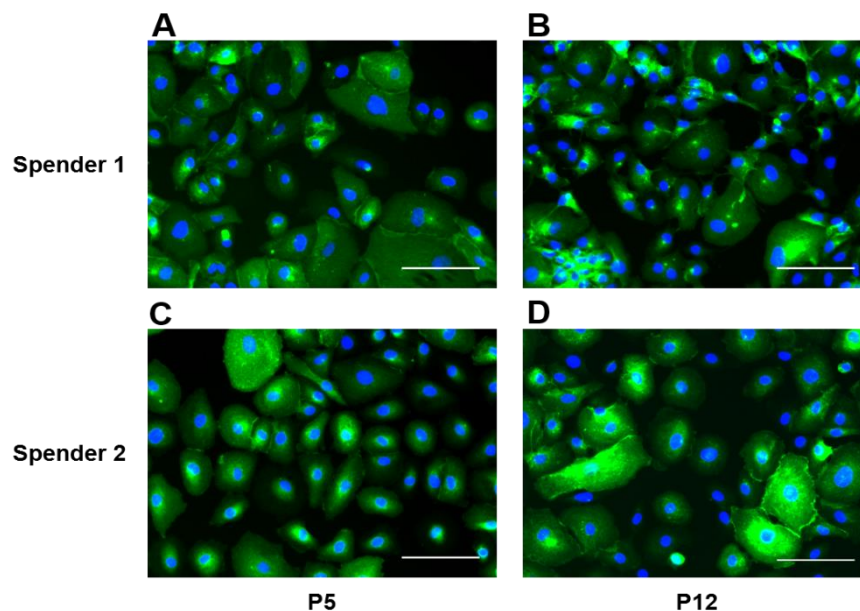


Abbildung 9: GGT1 Immunfluoreszenzfärbung von RPTEC.

(A) Färbung von RPTEC des Spenders 1 in Passage 5. (B) Färbung von RPTEC des Spenders 1 in Passage 12. (C) Färbung von RPTEC des Spenders 2 in Passage 5. (D) Färbung von RPTEC des Spenders 2 in Passage 12. Die GGT1-Färbung (grün) erfolgte mit Hilfe eines FITC-markierten Sekundärantikörpers. Die Kerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

Da CD13 als spezifischer Oberflächenmarker von RPTEC bekannt ist, wurde er bei der Isolation der Zellen bereits als Selektionsmarker verwendet (Baer et al., 1997). Die Expression von CD13 wurde ebenfalls auf RPTEC beider Spender mittels Durchflusszytometrie direkt nach der Isolation zur Bestimmung der Reinheit der isolierten Zellen im Vorfeld dieser Arbeit nachgewiesen. In dieser Arbeit wurde zusätzlich die Expression in den Passagen 5 und 12 gegen eine Isotyp-Kontrolle durchflusszytometrisch gemessen.

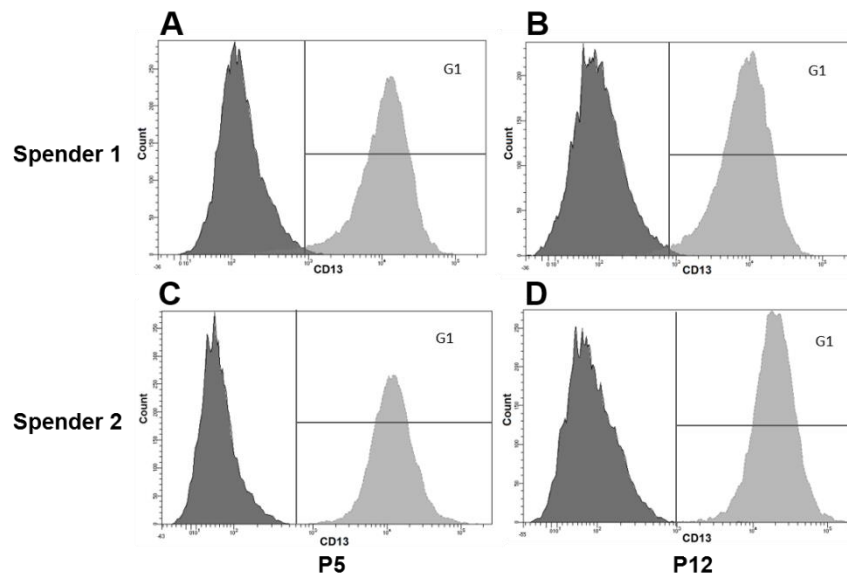


Abbildung 10: CD13 Nachweis auf RPTEC mittels Durchflusszytometrie.

(A) Färbung von RPTEC des Spenders 1 in Passage 5. (B) Färbung von RPTEC des Spenders 1 in Passage 12. (C) Färbung von RPTEC des Spender 2 in Passage 5. (D) Färbung von RPTEC des Spenders 2 in Passage 12. Zusätzlich zur Färbung mit CD13-Antikörper (hellgrau) wurde eine Färbung mit einem Isotyp-Antikörper (dunkelgrau) als Negativkontrolle durchgeführt. In den Diagrammen ist die Zellzahl gegen die gemessene CD13-Intensität aufgetragen. Als positive Zellen werden alle Zellen innerhalb des Gates G1 bezeichnet.

Von den RPTEC des Spenders 1 konnten in Passage 5 (Abbildung 10A) 97,4% der Zellen als CD13-positiv gemessen werden, in Passage 12 (Abbildung 10B) waren 98,7% der Zellen positiv. Von Spender 2 konnte in Passage 5 (Abbildung 10C) ein Prozentsatz von 99,7% als positiv nachgewiesen werden, in Passage 12 (Abbildung 10D) waren 99,9% der gemessenen Zellen gegenüber der Isotyp-Kontrolle CD13-positiv.

5.2 Anzucht von BKPyV Stämmen in 293TT Zellen

Für die Experimente dieser Arbeit wurden die archetypischen Stämme WWM12 und WWT, sowie der rearrangierten Dunlop-Stamm und das klinische Isolat M401 in 293TT Zellen angezüchtet. Zur Infektion von 293TT Zellen mit den Stämmen WWM12, WWT und M401 wurde Patientenurin mit mindestens 10^9 Gäg/ml verwendet. Die Anzucht des Dunlop-Stamms erfolgte mittels Transfektion

der 293TT Zellen mit dem Dunlop-Genom. Die NCCR-Sequenz der klinischen Isolate wurde vor der Infektion mittels Sequenzierung verifiziert. Die NCCR-Sequenz der Virusstocks wurde nach der Anzucht ebenfalls überprüft. Tabelle 10 zeigt eine Übersicht über alle in dieser Arbeit verwendeten Virusstocks. Eine genaue Beschreibung der Herstellung dieser Stocks befindet sich in Abschnitt 7.2 im Anhang.

Tabelle 10: Übersicht über alle in dieser Arbeit verwendeten Virusstocks.

Stamm	Viruslast des verwendeten Stocks
WWM12	$4,19 \times 10^9$
WWT	$6,27 \times 10^9$
M401	$1,16 \times 10^{10}$
Dunlop	$1,20 \times 10^{10}$

5.3 Quantifizierung der Infektiosität der Virusstämme

Die Quantifizierung der Stämme WWM12 und Dunlop erfolgte mit Hilfe eines *Fluorescent Focus Assays*. Dazu wurden RPTEC in 24-Well Platten mit 5×10^7 und 10^8 Gäq des WWM12 Stocks pro Well infiziert. Niedrigere Viruslasten führten zu keiner effizienten Infektion. Für höhere Viruslasten war das benötigte Volumen der Stocklösung zu hoch. Zur Quantifizierung des Dunlop Stocks wurden aufgrund des höheren Replikationspotenzials niedrigere Viruslasten von 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 bzw. 10^7 Gäq pro Well verwendet. Zum Nachweis infizierter Zellen wurde bei der Quantifizierung beider Stämme 5 Tage nach der Infektion eine Immunfluoreszenzfärbung des TAg durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt sollte das BKPyV in den infizierten Zellen einen kompletten Replikationszyklus durchlaufen haben. Dadurch wird gewährleistet, dass nur anfänglich infizierte Zellen bei der Quantifizierung gezählt werden. Zur Quantifizierung beider Stämme wurden je drei unabhängige Versuche durchgeführt und die Werte mit Hilfe der in 4.2.2.5 genannten Angaben und Formeln errechnet. Bei der folgenden Berechnung wird die Anzahl an TAg positiven Zellen (infizierten Zellen) mit den IE der Virusverdünnung gleichgesetzt. Die in den folgenden Tabellen gezeigten Werte stellen Mittelwerte aller Infektionen mit unterschiedlichen Viruslasten dar. Bei der Berechnung der IE pro ml Stock wurde die Ausgangsviruslast der Infektion verrechnet.

Tabelle 11 zeigt die bei der WWM12 Quantifizierung errechneten Parameter. Durchschnittlich wurden bei allen Infektionen 7,46 infizierte Zellen pro Bildausschnitt gezählt. Hochgerechnet auf die Wachstumsfläche des Wells konnten pro Well durchschnittlich 2323 Zellen nach fünf Tagen positiv für das TAg gefärbt werden. Da zur Infektion 0,2 ml verwendet wurden, betrug die Anzahl an infektiösen Einheiten pro ml der eingesetzten Verdünnung durchschnittlich 11614 infektiöse

Einheiten. Durch Miteinbeziehung der Viruslast der Stocklösung von $4,19 \times 10^9$ Gäq/ml und dem Verdünnungsfaktor bei Verdünnung auf 5×10^7 bzw. 10^8 Gäq pro Well ergab die Quantifizierung des Stocks eine Viruslast von 133.885 IE pro ml. Folglich sind für die Infektion mit einer IE 31.296 Gäq des Stocks notwendig.

Tabelle 11: Quantifizierung des WWM12 Stamms mit Hilfe des *Fluorescent Focus Assays*.

	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Mittelwert
Infizierte Zellen pro Bildausschnitt	6,57	6,87	8,93	7,46
Infizierte Zellen pro Well	2046	2139	2783	2323
IE pro ml	10229	10697	13916	11614
IE pro ml Stock	124683	117159	155209	133885
Gäq pro IE				31296

Bei der Dunlop Quantifizierung (Tabelle 12) wurden pro Bildausschnitt bei den Infektionen durchschnittlich 7,37 TAG positive Zellen gezählt. Pro Well entspricht das einer Zahl von durchschnittlich 2297 Zellen. Jeder ml der zur Infektion der Zellen eingesetzten Verdünnung enthielt durchschnittlich 11.485 IE. Nach Berücksichtigung der unterschiedlichen zur Infektion eingesetzten Verdünnungen konnte für die Dunlop-Stocklösung bei $1,2 \times 10^{10}$ Gäq/ml ein Wert von 5.927.049 IE/ml errechnet werden. Mit einer Zahl von 2020 Gäq pro IE war der verwendete Dunlop-Stock in diesen Experimenten im Vergleich zum WWM12-Stock etwa 15-fach potenter, da für die Infektion mit einer IE des WWM12 das 15-fache an Gäq wie für eine IE des Dunlop notwendig war.

Tabelle 12: Quantifizierung des Dunlop Stamms mit Hilfe des *Fluorescent Focus assays*.

	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Mittelwert
Infizierte Zellen pro Bildausschnitt	7,02	7,68	7,42	7,37
Infizierte Zellen pro Well	2186	2394	2311	2297
IE pro ml	10.930	11.969	11.557	11.485
IE pro ml Stock	6.561.303	5.907.042	5.345.802	5.927.049
Gäq pro IE				2020

5.4 Die Replikation des BKPyV in primären RPTEC

5.4.1 Die Replikation ist abhängig vom Zellkulturmedium

In Vorarbeiten zur Etablierung der Infektion von RPTEC mit archetypischen BKPyV wurden bereits verschiedene Experimente zur Abhängigkeit der viralen Replikation vom verwendeten Zellkulturmedium durchgeführt (siehe Masterarbeit). In dieser Arbeit sollte die Replikation sowohl des rearrangierten Dunlop-Stamms, als auch des archetypischen WWM12-Stamms in zwei verschiedenen Zellkulturmedien verglichen werden. Verwendet wurde das käuflich erwerbliche und bereits in mehreren Studien für BKPyV-Infektionen verwendete *Renal epithelial growth medium* (REGM, Lonza) und das selbst hergestellte, im Vorfeld dieser Arbeit etablierte BKPyV Infektionsmedium (BKIM) mit DMEM und Ham's F12 als Basis und FKS, Cholera toxin, Triiodthyronin und Insulin als Zusätze.

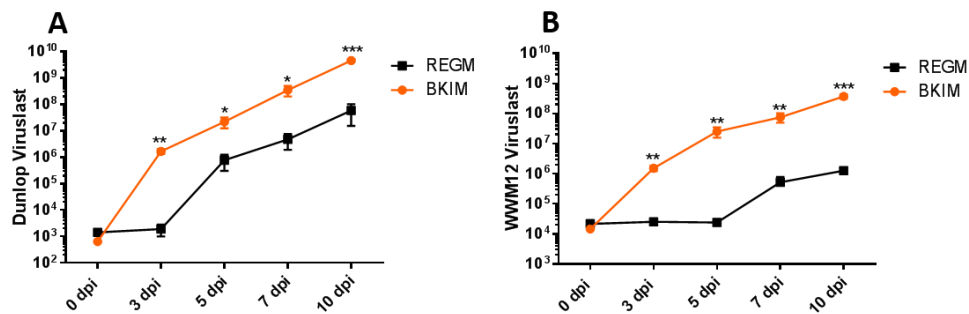


Abbildung 11: Vergleich der viralen Replikation in RPTEC in unterschiedlichem Medium.

Viruslast pro Well im Zellkulturüberstand mit Dunlop (A) und WWM12 (B) infizierter RPTEC. Verglichen wurde das käuflich erwerbliche REGM (Lonza) mit dem selbst hergestellten, im Vorfeld dieser Arbeit etablierten BKIM.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Zur besseren Übersicht sind die für die Zunahme der Viruslast errechneten Werte in Tabelle 13 zusammengefasst:

Tabelle 13: Gemessene Werte für die Zunahme der Viruslast der in Abbildung 11 gezeigten Experimente.

X-fache Zunahme der Viruslast im Vergleich zu Tag 0:	Tag 3	Tag 5	Tag 7	Tag 10
Dunlop REGM	1,34	545	3.348	41.168
Dunlop BKIM	2.606	34.436	$5,4 \times 10^5$	$7,17 \times 10^6$
WWM12 REGM	1,17	1,12	24	58
WWM12 BKIM	105	1.737	5.190	25.563

Über den gesamten Verlauf der Infektion konnte eine signifikant höhere Viruslast im Überstand der Dunlop infizierten Zellen, die in BKIM kultiviert wurden, verglichen mit Zellen in REGM,

nachgewiesen werden (Abbildung 11A). In RPTEC, die in REGM kultiviert wurden, nahm die Viruslast in den ersten drei Tagen nur um etwa 34% zu, 10 Tage nach der Infektion war die Viruslast um das 41.168-fache höher als direkt nach der Infektion. Im Überstand der in BKIM kultivierten Zellen konnte bereits nach drei Tagen eine 2606-fache Zunahme der Viruslast gemessen werden. Nach 10 Tagen war die Viruslast der Zellen in BKIM um das $7,17 \times 10^6$ -fache höher als direkt nach der Infektion. Im Vergleich zu den Zellen in REGM war die Viruslast von Zellen in BKIM nach drei Tagen somit um das 1944-Fache höher ($p = 0,0012$), nach 10 Tagen um das 174-Fache ($p = 0.00018$).

Eine signifikant höhere Viruslast wurde ebenfalls über den gesamten Verlauf der WWM12-Infektion im Überstand von RPTEC in BKIM, verglichen mit RPTEC in REGM, gemessen (Abbildung 11B). In den Überständen der in BKIM kultivierten Zellen nahm die Viruslast über die 10 Tage der Experimente um das 25586-Fache zu. Über den gesamten Verlauf von 10 Tagen nahm die Viruslast der in REGM kultivierten Zellen insgesamt nur um das 58-Fache zu. Die Viruslast der WWM12-infizierten Zellen in REGM nahm in den ersten drei Tagen nach der Infektion um nur 17% zu. Ein größerer Anstieg der Replikation des WWM12 in Zellen in REGM erfolgte erst zwischen Tag 5 und Tag 7. Im Vergleich mit den Zellen in BKIM war die an Tag 10 gemessene Viruslast dieser Zellen entsprechend 383-fach höher als die der Zellen in REGM ($p = 0,00054$). Für alle weiteren Infektionsexperimente wurde aufgrund dieser großen Unterschiede deshalb nur noch das BKIM verwendet.

Beim Vergleich der Replikation von Dunlop und WWM12 in BKIM konnte nach drei Tagen eine 25-fach, nach fünf Tagen eine 20-fach, nach sieben Tagen eine 104-fach und nach 10 Tagen eine 280-fach höhere Replikation von Dunlop gemessen werden. Die nach fünf Tagen gemessene 20-fach höhere Viruslast der Dunlop-infizierten Zellen entspricht somit in etwa der im *Flourescent focus assay* gemessenen 15-fach höheren Infektiosität des Dunlop.

5.4.2 Unterschiedliche Stämme des BKPyV replizieren in RPTEC verschiedener Spender

Im nächsten Schritt wurde die Replikation des WWT-Stamms und des M401-Isolats in Zellen des Spenders 1, sowie die Replikation von WWM12, Dunlop, WWT und M401 in RPTEC eines zweiten Spenders untersucht (Abbildung 12). Bei WWT handelt es sich um einen Stamm mit archetypischer NCCR, die sich im Vergleich zum WWM12 um sechs einzelne Basenaustausche unterscheidet (siehe Abbildung 32). Bei dem M401-Stamm handelt es sich um ein bisher unbeschriebenes klinisches Isolat, das im Rahmen dieser Arbeit aus dem Urin eines Patienten isoliert und angezüchtet wurde. Da die Viruslast der Isolate WWT und M401 nur durch qRT-PCR quantifiziert wurde und deshalb nur in Gäq/ml angegeben werden konnte, wurde für die Infektion

mit dem WWT die gleiche Konzentration an Gäg verwendet, die für eine Infektion mit WWM12 und einer MOI von 0,02 IE/Zelle benötigt wird. Entsprechend wurde bei der M401-Infektion die Gäg-Konzentration des Dunlop eingesetzt.

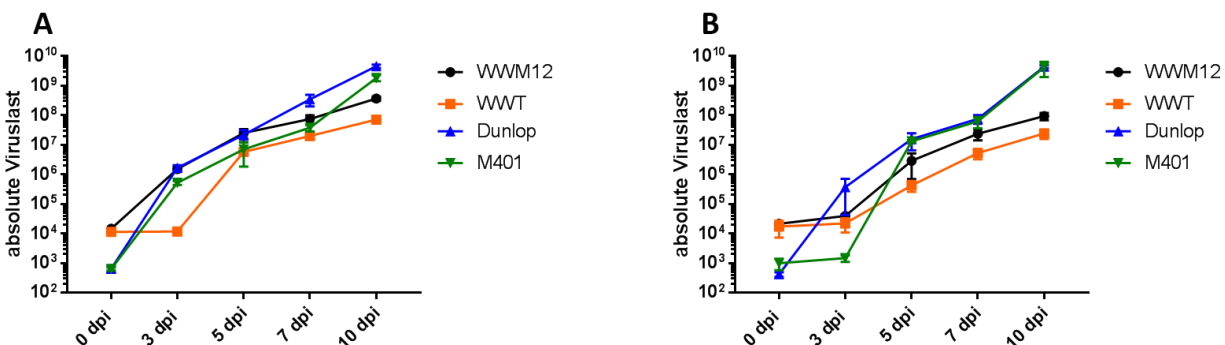


Abbildung 12: Vergleich der Replikation von WWT und M401 in RPTEC von Spender 1 und 2.

Viruslast pro Well im Zellkulturüberstand infizierte RPTEC von Spender 1 (A) und Spender 2 (B). Zur Infektion wurden die BKP-V-Stämme WWM12, WWT, Dunlop und M401 verwendet. Die zur Infektion verwendete Gäg-Konzentration wurde bei WWT an die verwendete Konzentration von WWM12 für eine MOI von 0,02 IE/Zelle angeglichen. Die Gäg-Konzentration zur Infektion mit M401 wurde entsprechend dem Dunlop-Stamm angeglichen. n. s. = nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Zunächst wurde die Replikation der Stämme WWT und M401 in RPTEC des Spenders 1 untersucht (Abbildung 12A). Die in Abbildung 12A für die Replikation von WWM12 und Dunlop gezeigten Daten entsprechen denen in Abbildung 11 (Infektion mit BKIM) und wurden zum besseren Vergleich in diese Abbildung mit aufgenommen. Eine Replikation des WWT-Stamms blieb in den ersten drei Tagen aus. Nach fünf Tagen konnte eine um 507-fach erhöhte Viruslast im Vergleich zu Tag 0 in den Überständen gemessen werden. Nach sieben Tagen lag die Viruslast um das 1753-Fache und nach 10 Tagen um das 6244-Fache über dem Ausgangswert. Abgesehen von Tag 3 war der Verlauf der Kurve vergleichbar mit der des WWM12-Stamms, aber die Replikation war allgemein niedriger. Die Replikation des M401-Stamms zeigte einen ähnlichen Kurvenverlauf wie die des Dunlop. Bereits nach drei Tagen wurde eine um das 817-Fache erhöhte Viruslast gemessen. Bis Tag 5 stieg die Viruslast um das 11136-Fache, bis Tag 7 um das 60410-Fache. Nach 10 Tagen wurde eine im Vergleich zu Tag 0 um das $2,92 \times 10^6$ -Fache angestiegene Viruslast gemessen.

Wie in Abbildung 12B erkennbar ist, war die Replikation dieser Stämme in den Zellen des zweiten Spenders vergleichbar aber allgemein etwas geringer. In den ersten drei Tagen nahm die Viruslast des WWM12 im Überstand der RPTEC des zweiten Spenders um 86% zu. Nach fünf Tagen wurde eine 137-fach höhere, nach sieben Tagen eine 1116-fach höhere Viruslast im Vergleich zum Ausgangswert gemessen. Über den gesamten Verlauf von 10 Tagen nahm die Viruslast um das 4449-Fache zu. Auch in diesen Zellen war der Kurvenverlauf des WWT-Stamms vergleichbar mit

dem WWM12-Stamm aber die allgemeine Replikation geringer. In den ersten drei Tagen nahm die WWT-Viruslast um 27% zu, nach fünf Tagen lag sie 25-fach höher als direkt nach der Infektion. Zwischen Tag 5 und 7 stieg die Viruslast auf einen 307-fach höheren, zwischen Tag 7 und 10 auf einen 1409-fach höheren Wert verglichen zum Ausgangswert. Die Viruslast des Dunlop-Stamms stieg in den ersten drei Tagen um das 890-Fache, innerhalb von fünf Tagen um das 37709-Fache an. Nach sieben Tagen wurde ein Anstieg um das $1,83 \times 10^5$ -Fache, nach 10 Tagen ein Anstieg um das $1,07 \times 10^6$ -Fache im Vergleich zum Ausgangswert gemessen. Mit Ausnahme des Werts nach drei Tagen, war der Kurvenverlauf der Viruslast M401 infizierter RPTEC des Spenders 2 fast identisch zum Verlauf der Dunlop-Replikation in diesem Spender. Nach drei Tagen wurde ein Anstieg der Viruslast des M401 um 47% gemessen, zwischen Tag 3 und Tag 5 stieg die Viruslast auf das 13426-Fache im Vergleich zu Tag 0. Nach sieben Tagen war die Viruslast um das 62525-Fache, nach 10 Tagen um das $4,25 \times 10^6$ -Fache höher als direkt nach der Infektion. Auch wenn der Kurvenverlauf der Replikation in beiden RPTEC-Spendern vergleichbar war, war die Replikation der untersuchten Stämme in RPTEC von Spender 1 besser. Für weitere Charakterisierungen wurde der Stamm WWM12 als Archetyp und der Dunlop als rearrangierter Stamm verwendet.

5.5 Charakterisierung der Virusstämme

5.5.1 Dunlop repliziert besser als WWM12

Da die zu verschiedenen Zeitpunkten im Überstand gemessene Viruslast keine genaue Aussage über die virale Genexpression zulässt, wurde diese im nächsten Schritt mit Hilfe eines Westernblots gemessen. Untersucht wurde die Expression des TAg und des VP1. Sowohl bei Dunlop, also auch WWM12 infizierten Zellen konnte unter den gewählten Kulturbedingungen keine TAg oder VP1 Expression drei Tage nach der Infektion nachgewiesen werden (Abbildung 13A). In Dunlop infizierten Zellen konnte nach sieben Tagen eine deutliche Expression beider Proteine detektiert werden, in WWM12 infizierten Zellen war diese Expression deutlich schwächer. Auch nach 10 Tagen war die Expression in Dunlop infizierten Zellen deutlich stärker.

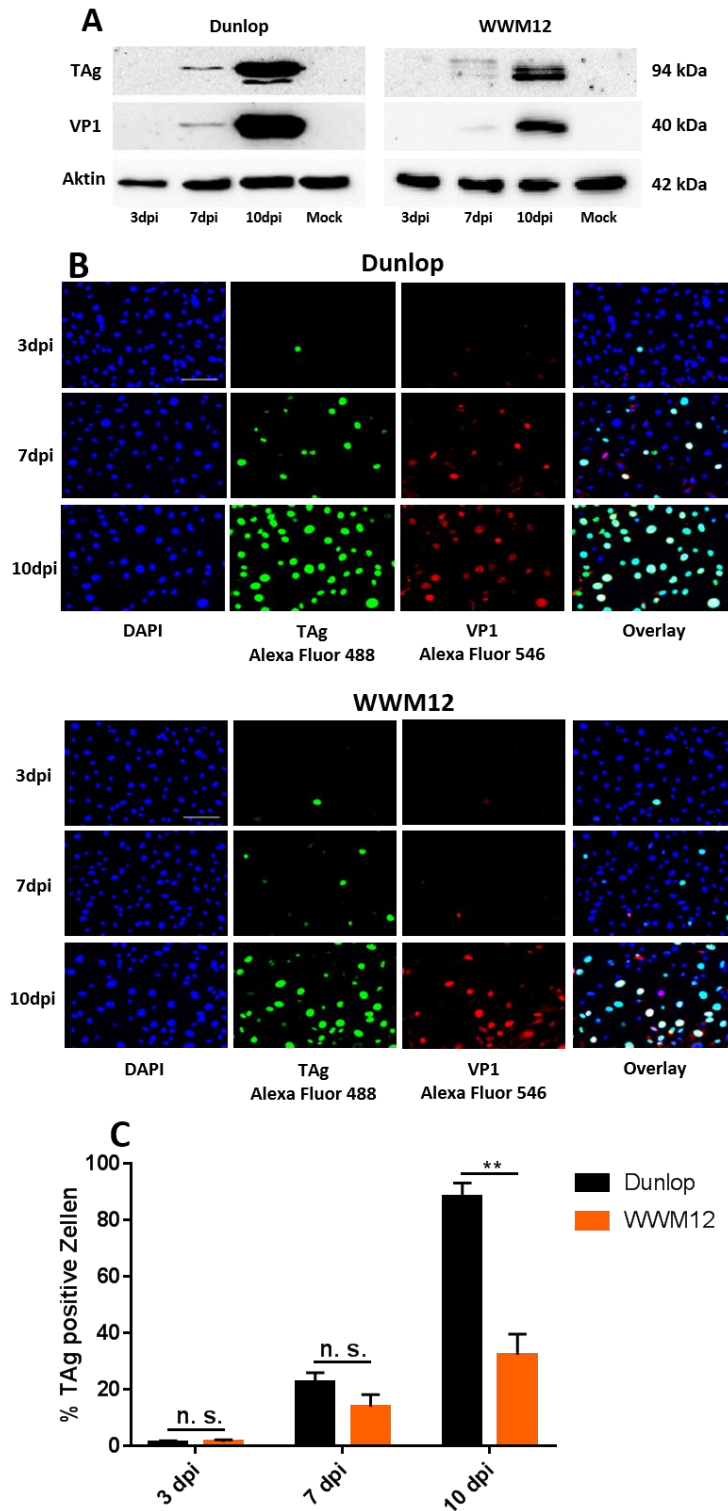


Abbildung 13: Messung der Proteinexpression des TAg und des VP1 und Quantifizierung infizierter Zellen.

(A) Die TAg- und VP1-Expression in Dunlop und WWM12 infizierten Zellen wurde mittels Westernblot nachgewiesen. Zusätzlich wurden uninfizierte Zellen als Negativkontrolle gefärbt. (B) Immunfluoreszenzfärbung des TAg und VP1 in Dunlop und WWM12 infizierten Zellen. Die Zellkerne wurden zusätzlich mit DAPI gefärbt. (C) Quantifizierung der infizierten (TAg positiven) Zellen. Aus dem Verhältnis zu den DAPI-positiven wurde der Prozentsatz der TAg positiven Zellen errechnet. Zur Quantifizierung wurden Werte von drei Experimenten gemittelt. n. s. = nicht signifikant, ** $p < 0,01$.

Mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung sollte anschließend der Prozentsatz an infizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten anhand der TAg Expression bestimmt werden. Wie in Abbildung 13B erkennbar ist, konnte qualitativ bereits eine stärkere TAg- und VP1-Expression der Dunlop infizierten Zellen beobachtet werden. Durch eine Quantifizierung mit Hilfe der DAPI-gefärbten Zellen (Gesamtzellzahl) konnte der Prozentsatz an infizierten (TAg positiven) Zellen genau bestimmt werden. Nach drei Tagen konnte bei der Dunlop Infektion durchschnittlich ein Prozentsatz von 1,21% positiver Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 13C). Mit 1,49% lag dieser Wert bei der WWM12 Infektion um 23% höher ($p = 0,643$). Nach sieben Tagen betrug der Anteil Dunlop infizierter Zellen an der Gesamtzellzahl durchschnittlich 22,52%, der Anteil an WWM12 infizierten Zellen 13,85%. Somit war er bei den Dunlop infizierten Zellen um 62,6% ($p = 0,054$) höher. Am Ende des Experiments nach 10 Tagen waren 88,13% der Zellen mit dem Dunlop-Stamm, sowie 32,31% mit dem WWM12 infiziert. Der Anteil Dunlop infizierter Zellen war somit um das 2,73-Fache höher ($p = 0,0004$).

Auffällig beim Vergleich der Färbungen in Abbildung 12B war ebenfalls, dass unabhängig der Prozentsätze der gefärbten Zellen die TAg- und VP1-Färbung der Dunlop-infizierten Zellen stärker war. Aufgrund dieser Beobachtungen und Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass der WWM12-Stamm zwar mindestens genau so effizient wie der Dunlop-Stamm infiziert, die allgemeine Replikation des Dunlop-Stamms pro Zelle aber deutlich höher ist.

5.5.2 Beide Stämme sind passagierbar und produzieren infektiöse Nachkommen

Nachdem die virale Replikation des WWM12 und des Dunlop mittels Messung der Viruslast im Zellkulturüberstand und auf Ebene der Proteinexpression nachgewiesen werden konnte, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob beide Stämme passagierbar sind und in der Lage, infektiöse Nachkommen zu produzieren. Dazu wurden 10 Tage nach der Infektion gesammelte Überstände der in Abschnitt 5.4.1 beschriebenen Experimente mit BKIM verwendet und in der gleichen Gärg-Konzentration wie der Ausgangsinfektion verwendet. Die NCCR der passagierten Viren wurde nicht untersucht.

Über den gesamten Verlauf der Infektion konnte beim Vergleich der Dunlop-Replikation mit dem passagierten Virus (Abbildung 14A) kein signifikanter Unterschied der Viruslast gemessen werden. Nach drei Tagen war die Viruslast des passagierten Virus um 18% höher ($p = 0,568$), nach 5 Tagen um 17% geringer ($p = 0,548$), nach 7 Tagen um 26% geringer ($p = 0,447$) und nach 10 Tagen um das 2,34-Fache höher ($p = 0,059$) als die der mittels des Stocks infizierten Zellen. Bei der WWM12 Infektion war die Replikation des passagierten Virus (Abbildung 14B) nach drei Tagen mit einer um 73% niedrigeren gemessenen Viruslast ($p = 0,0032$) signifikant geringer als

die des Virusstocks. Im weiteren Verlauf der Versuche replizierte das passagierte Virus signifikant besser als der Stock mit einer 2,4-fachen Viruslast an Tag 5 ($p = 0,0036$), einer 3,3-fachen Viruslast an Tag 7 ($p = 0,0084$), und einer 4,5-fach höheren Viruslast 10 Tage nach der Infektion ($p = 0,024$).

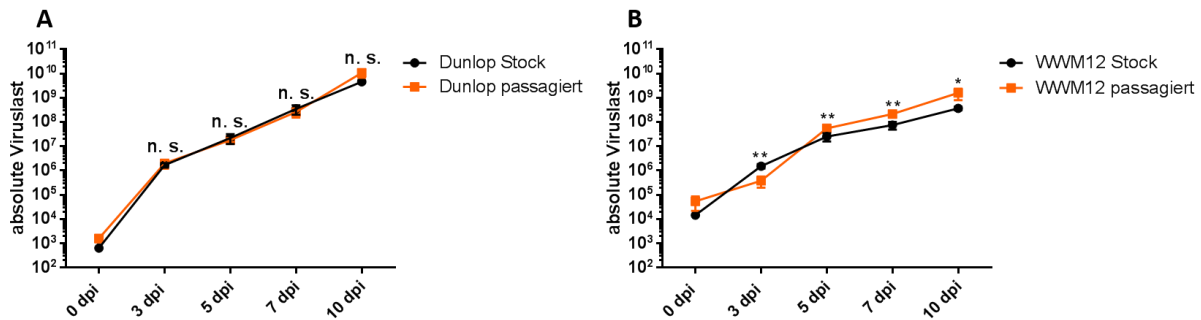


Abbildung 14: Passagierbarkeit des Dunlop- und WWM12-Stamms.

Viruslast pro Well im Zellkulturüberstand mit Dunlop (**A**) und WWM12 (**B**) infizierter RPTEC. Verglichen wurde die Infektion des Virusstock mit einem jeweils aus vorherigen Versuchen passagierten Isolat des jeweiligen Stamms mit identischer Gäq-Konzentration. n. s. = nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Zusätzlich wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen WWM12 infizierter Zellen erstellt. Dazu wurden RPTEC in 6-Well Platten mit dem WWM12-Stock infiziert und die Zellen 21 Tage nach der Infektion fixiert. Die Vorbereitung der Proben und die elektronenmikroskopische Aufnahme der Zellen erfolgte durch Lars Möller vom Robert Koch Institut in Berlin. Abbildung 15 zeigt Aufnahmen von verschiedenen Phasen des viralen Lebenszyklus des BKPyV. Mit Hilfe dieser Aufnahmen konnte die endozytotische Aufnahme von BKPyV-Virionen in die Zelle dokumentiert werden (Abbildung 15A). Abbildung 15B zeigt den vesikulären Transport der aufgenommenen Virionen durch die Zelle. In Abbildung 15C ist die Assemblierung von Nachkommen-Virionen im Zellkern sichtbar. Abbildung 15D zeigt eine Vakuolisierung von Virionen im Zytoplasma.

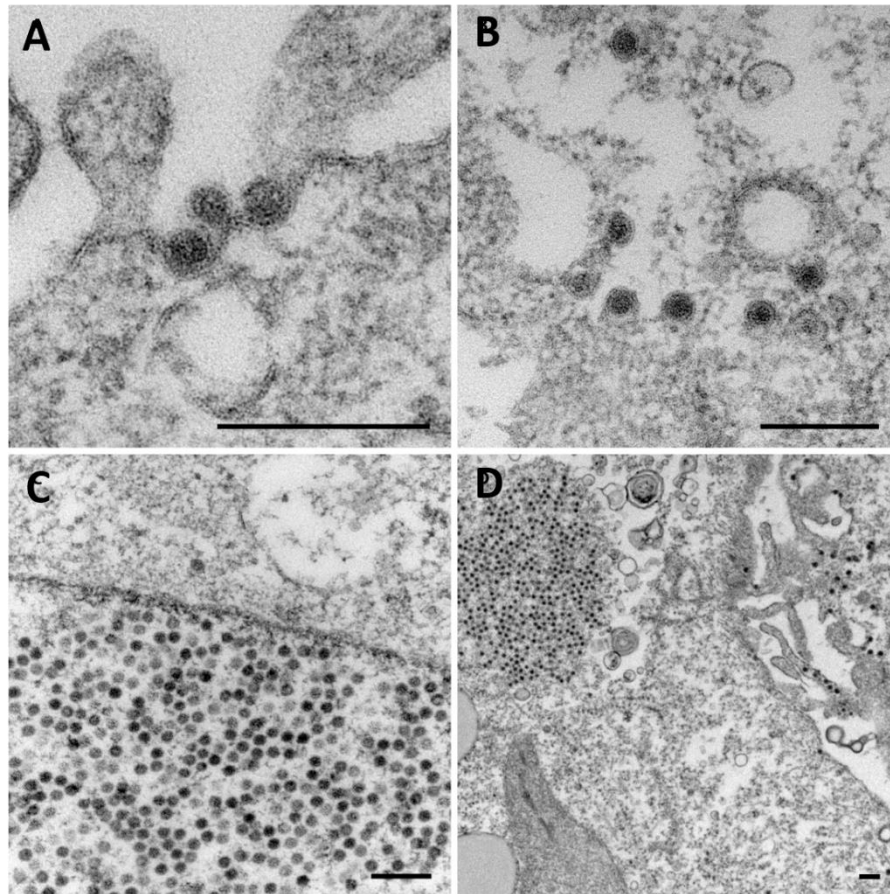


Abbildung 15: Elektronenmikroskopische Aufnahme WWM12 infizierter RPTEC.

RPTEC wurden mit dem WWM12-Stock infiziert und nach 21 Tagen fixiert. Die Aufnahme erfolgte durch Lars Möller am Robert Koch Institut in Berlin. **(A)** Verschiedene Phasen der Endozytose von Virionen. **(B)** Intrazellulärer Transport von Virionen **(C)** Assemblierung von Nachkommen-Virionen im Nucleus. **(D)** Vakuolisierung von Virionen im Zytoplasma. Maßstabskala = 200 nm.

5.5.3 Die Sequenz der NCCR des Archetyps ist stabil

Wie bereits in früheren Studien gezeigt wurde, etablieren sich bei der Replikation archetypischer BKPyV-Stämme, vor allem nach Passagierung, häufig rearrangierte Formen als Adaptation an die Zellkulturbedingungen (Howley et al., 1975; Rubinstein et al., 1991). Zur Untersuchung, ob im Verlauf der Infektion in diesem Zellkulturmodell Rearrangements in der WWM12-NCCR auftreten, wurde die NCCR in 45 Überständen mittels Sequenzierung analysiert. Bei diesen Überständen handelte es sich um Überstände aus 45 unabhängigen Experimenten, die 10 Tage nach der Infektion gesammelt wurden. Die RPTEC dieser Versuche wurden alle mit dem gleichen WWM12-Stock, bzw. einem WW-Stock, der in Vorversuchen zu dieser Arbeit verwendet wurde, infiziert und nicht behandelt, bzw. bei Medikamententests mit DMSO als Negativkontrolle behandelt. Durch diese Untersuchung sollte ebenfalls gezeigt werden, dass die effiziente Replikation des Archetyps nicht durch Rearrangements des Virus zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion bedingt ist. Eine

Übersicht über die Ergebnisse dieser Sequenzierung ist in Tabelle 14 dargestellt. Alignments aller 44 auswertbaren Sequenzen dieses Experiments befinden sich in Abschnitt 7.3 im Anhang. Die Anzahl der Mutationen bezieht sich jeweils auf den zur Infektion verwendeten Stamm (WW oder WWM12).

Tabelle 14: Ergebnisse der Sequenzierung der NCCR aus Überständen WWM12 infizierter RPTEC.

	unverändert	eine Punktmut.	zwei Punktmut.	drei bis acht Punktmut.	potenziell rearrangiert	Summe
Anzahl Sequenzen	27	11	3	3	1	45
Anteil	60%	24,44%	6,67%	6,67%	2,22%	100%

Von den 45 sequenzierten Proben konnte eine unveränderte NCCR-Sequenz in 27 Proben bzw. 60% nachgewiesen werden (Tabelle 14). Bei 11 Proben (24,44%) enthielt die Sequenz eine Punktmutation im Vergleich zur ursprünglichen WWM12-NCCR. Zwei Punktmutationen wurden in drei Proben (6,67%) gefunden und mehr als zwei Punktmutationen (drei bis acht) ebenfalls in drei Proben (6,67%). Bei nur einer Probe (2,22%) traten bei der Sequenzierung Mischsignale auf, die keine eindeutige Auswertung der Sequenz zuließen. Bei dieser Probe ist von einem Gemisch teilweise rearrangierter NCCs auszugehen. Bezogen auf die Gesamtheit der analysierten Proben bedeutet das, dass in etwa 98% der Ansätze über einen 10-tägigen Versuchsverlauf von einer stabilen Replikation des Archetyps ohne signifikante NCCR-Veränderung auszugehen ist.

5.6 Der Einfluss von Teriflunomid auf die Replikation des BKPyV

Zur Untersuchung des Effekts von Wirkstoffen auf die BKPyV-Replikation wurde zunächst das Medikament Teriflunomid (A771726) getestet. Dabei handelt es sich um den aktiven Metaboliten des Immunsuppressivums Leflunomid, welcher in einem anderen Zellkultursystem bereits gegen die Replikation des Dunlop getestet wurde (Bernhoff et al., 2010). Verwendet wurde Teriflunomid in einer Konzentration von 10 und 20 μM . Eine Behandlung mit DMSO diente als Kontrolle. Neben der Quantifizierung der Viruslast im Zellüberstand wurde mit den Zellen zur Messung des relativen Zellwachstums ein Neutralrot-Test durchgeführt.

Beide Konzentrationen von Teriflunomid hatten einen leichten inhibitorischen Effekt auf die Replikation sowohl des Dunlop-, als auch des WWM12-Stamms. Bei Behandlung der Dunlop infizierten Zellen (Abbildung 16A) konnte an Tag 7 nach der Infektion durch die Behandlung mit 10 μM Teriflunomid eine Reduktion der Viruslast um 29% ($p = 0,132$) und an Tag 10 nach der Infektion um 14% ($p = 0,718$) erreicht werden. Mit einer 20 μM Konzentration konnte nach sieben

Tagen eine 45% niedrigere ($p = 0,007$) Viruslast und nach 10 Tagen eine 36% niedrigere Viruslast ($p = 0,409$) im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Zellen nachgewiesen werden. Bei der Analyse des Zellwachstums über die Dauer der Infektion konnten zwischen der Kontrolle und den mit Teriflunomid behandelten Zellen keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Nach sieben Tagen lagen die im Neutralrot-Test gemessenen Werte der mit 10 μM Teriflunomid behandelten Zellen um etwa 4,5% höher als bei der DMSO-Kontrolle ($p = 0,894$), das relative Zellwachstum der mit 20 μM behandelten Zellen war im Vergleich zur Kontrolle um 12% niedriger ($p = 0,723$). Die an Tag 10 gemessenen Werte des relativen Zellwachstums waren nahezu identisch.

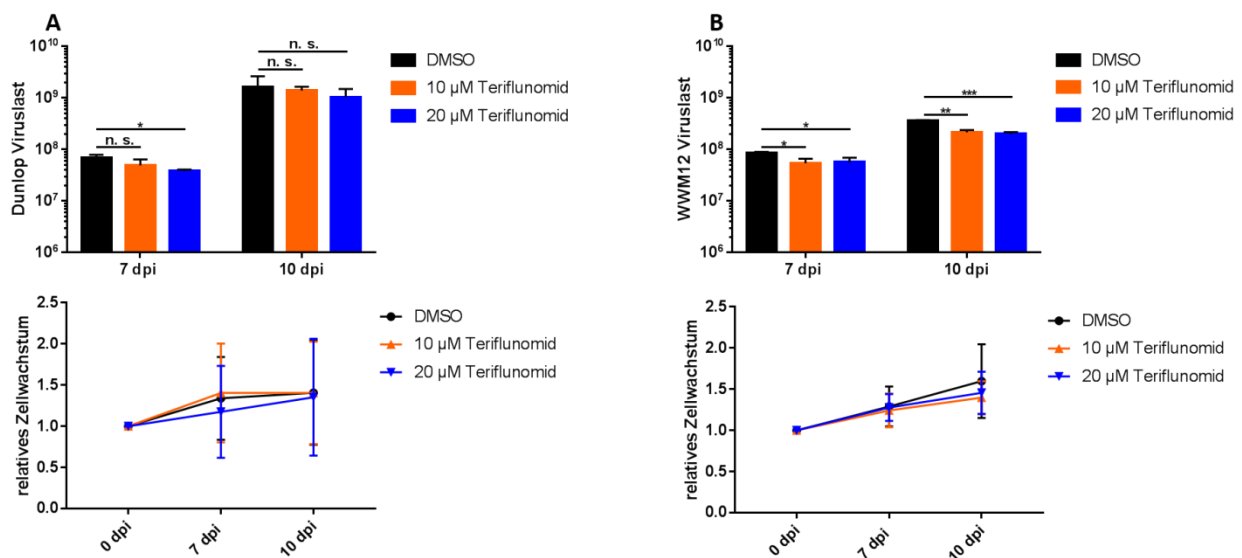


Abbildung 16: Effekt von Teriflunomid auf die Replikation des BKPvV und das Wachstum der RPTEC.

Absolute Viruslast im Zellkulturüberstand und relatives Zellwachstum von Dunlop (A) und WWM12 (B) infizierten und mit 10 μM oder 20 μM Teriflunomid-Konzentration behandelten Zellen. Als Kontrolle dienten infizierte und mit DMSO behandelte Zellen. Zur Berechnung des relativen Zellwachstums wurden die Werte des Neutralrot-Tests auf die Werte von Tag 0 (direkt nach der Infektion) normiert. n. s. = nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

In den WWM12 infizierten Zellen (Abbildung 16B) führte eine Behandlung mit 10 μM Teriflunomid nach sieben Tagen zu einer um 37% verringerten Viruslast ($p = 0,012$) und nach 10 Tagen zu einer um 39% verringerten Viruslast ($p = 0,0007$). Eine Behandlung der Zellen mit 20 μM Teriflunomid hatte im Vergleich zur Kontrolle eine um 34% geringere Viruslast nach sieben Tagen ($p = 0,018$) und eine um 44% geringere Viruslast nach 10 Tagen ($p = 0,0003$) zur Folge. Ebenso wie bei den Dunlop infizierten Zellen hatte Teriflunomid keine signifikanten Auswirkungen auf das Zellwachstum. Während das gemessene relative Zellwachstum nach 7 Tagen in allen Ansätzen fast gleich war, waren die Werte der mit 10 μM behandelten Zellen nach 10 Tagen um 12,5% niedriger ($p = 0,52$) und die Werte der mit 20 μM behandelten Zellen durchschnittlich um 8,8%

niedriger als die der Kontrolle. Die Inhibition der WWM12 Replikation war verglichen mit der Inhibition der Dunlop Replikation geringfügig stärker.

5.7 Die Interaktion des BKPyV mit der Regulation des Zellzyklus

Um neue geeignete Ansatzpunkte für eine antiviral wirksame Therapie zu finden, wurde der Einfluss des Dunlop und WWM12 Stamms auf die Expression von wichtigen Zellzyklusregulatoren untersucht. Da das BKPyV auf die zelluläre Maschinerie zur DNA-Replikation angewiesen ist, ist ein Eingriff des Virus in die Regulation des Zellzyklus wie bereits in Abschnitt 3.2.4.1 der Einleitung beschrieben wurde, notwendig. Eine Induktion der Expression von Cyclin E2 und CDK1 durch den rearrangierten TU-Stamm konnte auf mRNA-Ebene durch eine Genexpressionsanalyse bereits gezeigt werden (Abend et al., 2010). In dieser Arbeit wurden die Zellen mit dem Dunlop oder WWM12 infiziert und nach drei, sieben und 10 Tagen wurde die Gesamt-RNA der Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe einer qRT-PCR erfolgte der Nachweis der mRNA-Expression der Gene von Cyclin E1 und E2, sowie CDK1 und CDK2. Die in den folgenden Abbildungen gezeigten Werte wurden auf die jeweiligen Werte nicht-infizierter Kontrollzellen zu den jeweiligen Zeitpunkten normiert. Ebenfalls wurde eine Proteinextraktion der kompletten Zellen durchgeführt und die Expression oben genannter Proteine mittels Westernblot analysiert.

5.7.1 Dunlop induziert die Expression von Cyclin E1/E2 und CDK1/2

Eine Infektion mit dem Dunlop-Stamm führte in den RPTEC auf mRNA-Ebene nach drei Tagen zu einer 1,16-fach erhöhten, nach sieben Tagen zu einer 17-fach erhöhten und nach 10 Tagen zu einer 199-fach erhöhten Expression des CDK1-Gens im Vergleich zu uninfizierten Zellen (Abbildung 17A). Die mRNA-Expression von CDK2 wurde durch die Dunlop Infektion nach drei Tagen um das 1,14-Fache, nach sieben Tagen um das 6-Fache und nach 10 Tagen um das 25-Fache erhöht. Eine Untersuchung der mRNA-Expression der Cycline E1 und E2 ergab in Dunlop infizierten Zellen eine nach drei Tagen um 7% erhöhte, nach sieben Tagen um das 7-Fache und nach 10 Tagen eine um das 25-Fache erhöhte Expression des CCNE1-Gens (Abbildung 17B). Die Expression des CCNE2-Gens wurde durch den Dunlop nach drei Tagen um 62%, nach sieben Tagen um das 57-Fache und nach 10 Tagen um das 523-Fache induziert im Vergleich zur Kontrolle. Im Vergleich zur mRNA-Expression waren die Effekte von Dunlop auf die Cycline E1 und E2 auf Proteinebene nur sehr schwach. Im Vergleich dazu konnte bei der Proteinexpression von CDK1 nach 10 Tagen eine signifikante Induktion um das 22-Fache ($p = 0,0011$) im Westernblot nachgewiesen werden (Abbildung 17C). Eine hoch signifikante Induktion der CDK2-Expression um das 15-Fache ($p < 0,0001$) im Vergleich zur uninfizierten Kontrolle konnte ebenfalls mittels Westernblot nachgewiesen werden.

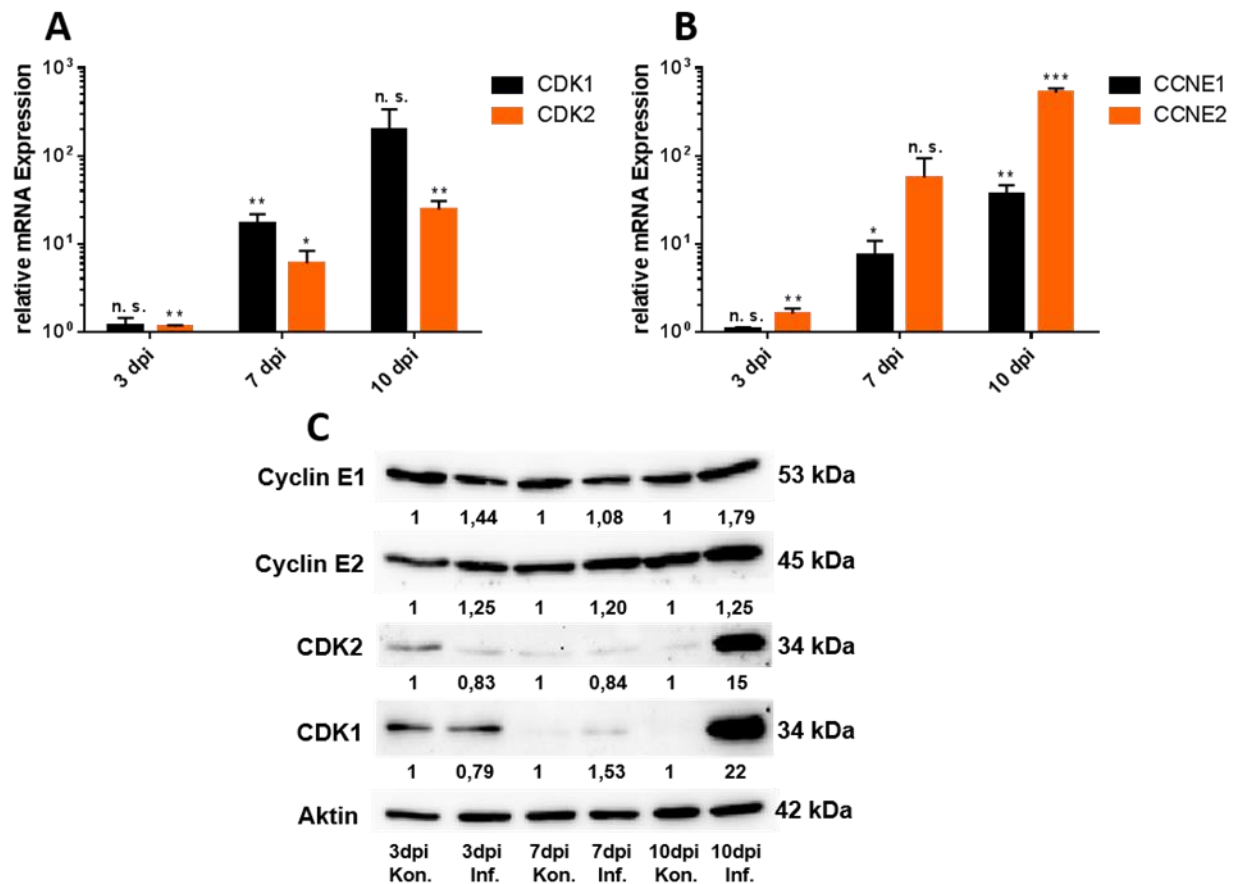


Abbildung 17: Einfluss der WWM12-Infektion auf die Expression von Cyclin E1 und E2 und CDK1 und 2.

Messung der mRNA-Expression von CDK1 und CDK2 (**A**) bzw. Cyclin E1 und E2 (**B**) in Dunlop infizierten Zellen. Die dargestellten Werte stellen die auf die Expression in uninfizierten Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten normierten Werte dar. Die Proteinexpression von Cyclin E1 und E2, sowie CDK1 und 2 wurde mittels Westernblot gemessen (**C**). Die unter den Banden stehenden Werte stellen die relativen Intensitäten der Banden normiert auf die Expression von β -Aktin dar. Für die Quantifizierung der Proteinexpression von CDK2 wurden die Ergebnisse von vier Versuchen, für die Quantifizierung von CDK1 die Ergebnisse von zwei Versuchen gemittelt. n. s. = nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.7.2 WWM12 induziert die Expression von Cyclin E1/E2 und CDK1/2

Eine Induktion mRNA-Expression der CDK1 und 2 konnte ebenfalls in WWM12 infizierten Zellen beobachtet werden (Abbildung 18A). In infizierten Zellen war die Expression von CDK1 nach drei Tagen um 7% höher ($p = 0,52$), nach sieben Tagen um 46% höher ($p = 0,2$), nach 10 Tagen um das 3-Fache höher ($p = 0,05$) und nach 14 Tagen um das 9-Fache höher ($p < 0,0001$). Die Expression von CDK2 wurde in infizierten Zellen im Vergleich zu uninfizierten Zellen nach drei Tagen und sieben Tagen je um 5% induziert ($p = 0,6$; $p = 0,31$). Nach 10 Tagen konnte eine um 76% höhere CDK2 Expression ($p = 0,0006$) und nach 14 Tagen eine um das 5-fach höhere CDK2-Expression ($p = 0,01$) gemessen werden. Nach drei Tagen konnte noch keine erhöhte CCNE1-Expression gemessen werden (Abbildung 18B). Nach sieben Tagen wurde die CCNE1-Expression durch WWM12 aber um 17% ($p = 0,024$), nach 10 Tagen um 85% ($p = 0,0009$) und

nach 14 Tagen um das 7,6-Fache ($p = 0,006$) erhöht. Die Expression von CCNE2 war in infizierten Zellen nach drei Tagen um 27% höher ($p = 0,18$), nach sieben Tagen um das 2,86-Fache ($p = 0,0017$), nach 10 Tagen um das 9,2-Fache ($p = 0,0016$) und nach 14 Tagen um das 144-Fache höher ($p = 0,017$) als in der Kontrolle. Auf Proteinebene konnte ebenso wie bei Dunlop infizierten Zellen keine signifikante Induktion der Cyclin E1 oder E2 Expression beobachtet werden (Abbildung 18C). Dagegen konnte eine durchschnittlich 11-fache Induktion der CDK1-Proteinexpression ($p = 0,37$) nach 10 Tagen nachgewiesen werden. Auch die CDK2-Expression war durch WWM12 nach sieben Tagen um das 3-Fache ($p = 0,116$) und nach 10 Tagen signifikant um das 2,9-Fache ($p = 0,0005$) erhöht.

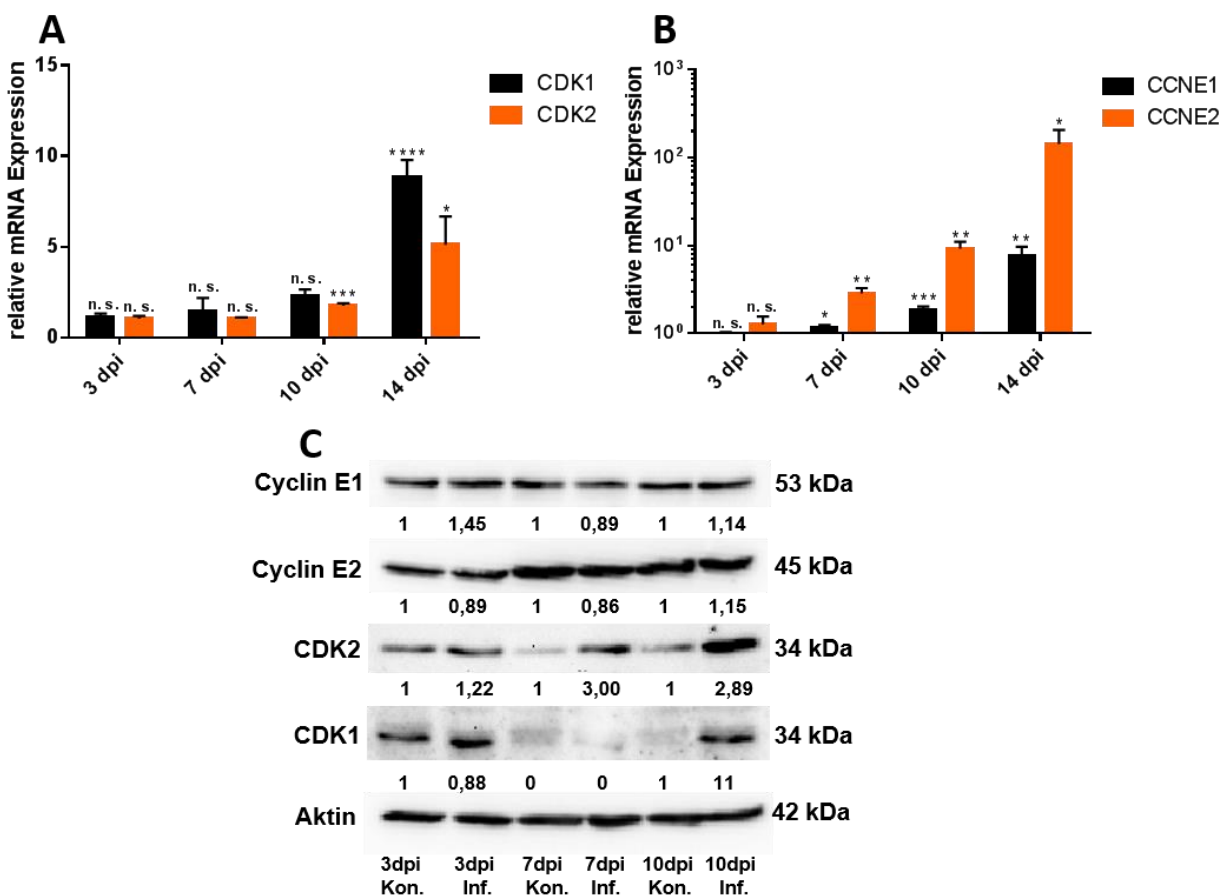


Abbildung 18: Einfluss der Dunlop-Infektion auf die Expression von Cyclin E1 und E2 und CDK1 und 2.

Messung der mRNA-Expression von CDK1 und CDK2 (**A**) bzw. Cyclin E1 und E2 (**B**) in WWM12 infizierten Zellen. Die dargestellten Werte stellen die auf die Expression in uninfizierten Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten normierten Werte dar. Die Proteinexpression von Cyclin E1 und E2, sowie CDK1 und 2 wurde mittels Westernblot gemessen (**C**). Die unter den Banden stehenden Werte stellen die relativen Intensitäten der Banden normiert auf die Expression von β -Aktin dar. Für die Quantifizierung der Proteinexpression von Cyclin E1 wurden die Ergebnisse von vier Versuchen, für die Quantifizierung von CDK1 die Ergebnisse von zwei Versuchen gemittelt. n. s. = nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.7.2 Der CDK1-Inhibitor Ro-3306 inhibiert die Replikation von Dunlop und WWM12

Aufgrund der in 5.7.1 und 5.7.2 nachgewiesenen Induktion der Proteinexpression von CDK1 und CDK2 sollte im nächsten Schritt eine Inhibition von CDK1 als Ansatzpunkt für eine Inhibition der Replikation des BKPyV getestet werden. Dazu wurden die Zellen mit Dunlop oder WWM12 infiziert und der CDK1-Inhibitor Ro-3306 wurde zur Behandlung der Zellen verwendet.

Die Behandlung von Dunlop infizierten Zellen (Abbildung 19A) mit einer 1 μM Konzentration von Ro-3306 führte nach sieben Tagen zu einer 43% geringeren Viruslast ($p = 0,092$), nach 10 Tagen zu einer 73% geringeren Viruslast ($p = 0,145$) im Vergleich zur Kontrolle. Durch eine Behandlung der infizierten Zellen mit 10 μM Ro-3306 wurde die Viruslast nach sieben Tagen signifikant um 92% ($p = 0,0017$) und nach 10 Tagen um 99,4% ($p = 0,064$) reduziert. Eine 20 μM Ro-3306 Konzentration im Zellkulturmedium führte sowohl nach sieben Tagen ($p = 0,0017$), als auch nach 10 Tagen ($p = 0,065$) zu einer kompletten Inhibition der viralen Replikation. Eine 1 μM bzw. 5 μM Ro-3306 Konzentration im Zellkulturmedium hatte keine signifikanten Auswirkungen auf das Zellwachstum, die Behandlung der Zellen mit 20 μM Ro-3306 führte nach sieben Tagen zu einem signifikant um 70% im Vergleich zur Kontrolle verringerten relativem Zellwachstum ($p = 0,011$). Nach 10 Tagen wurde ein signifikant um 74% verringertes relatives Zellwachstum ($p = 0,0007$) der mit 20 μM Ro-3306 behandelten Zellen gemessen.

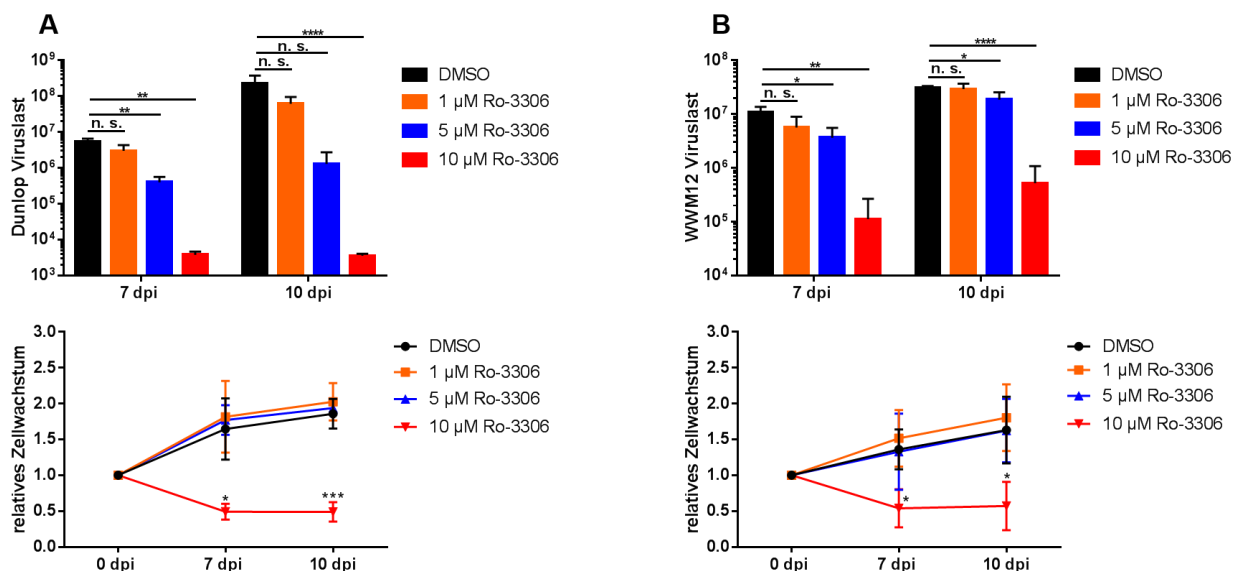


Abbildung 19: Effekt von Ro-3306 auf die Replikation des BKPyV und das Wachstum der RPTEC.

Absolute Viruslast im Zellkulturüberstand und relatives Zellwachstum von Dunlop (A) und WWM12 (B) infizierten und mit 1 μM , 5 μM oder 10 μM Ro-3306-Konzentration behandelten Zellen. Als Kontrolle dienten infizierte und mit DMSO behandelte Zellen. Zur Berechnung des relativen Zellwachstums wurden die Werte des Neutralrot-Tests auf die Werte von Tag 0 (direkt nach der Infektion) normiert. n. s. = nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

Auf die Replikation und das Zellwachstum WWM12 infizierter RPTEC konnten nach Ro-3306-Behandlung ähnliche Effekte beobachtet werden (Abbildung 19B). Durch eine 1 μM Konzentration von Ro-3306 im Medium WWM12 infizierter RPTEC konnte die Viruslast nach sieben Tagen um 48% ($p = 0,11$), nach 10 Tagen nur um 5,8% ($p = 0,715$) im Vergleich zur Kontrolle gesenkt werden. Eine 5 μM Ro-3306 Konzentration führte an Tag sieben zu einer um 66% verringerten ($p = 0,023$) und nach 10 Tagen zu einer um 40% verringerten viralen Replikation ($p = 0,042$). Die Behandlung der infizierten Zellen mit einer 10 μM Ro-3306 Konzentration führte zu einer nach sieben Tagen um 99% ($p = 0,0031$) und nach 10 Tagen um 98% ($p < 0,0001$) verringerten Viruslast im Zellüberstand. Beim Neutralrot-Test der mit WWM12 infizierten RPTEC konnte ebenso wie bei den mit Dunlop infizierten RPTEC keine signifikanten Effekte der 1 μM und 5 μM Ro-3306 Behandlung gemessen werden. Eine Behandlung mit einer 10 μM Konzentration führte ähnlich der mit Dunlop infizierten Zellen zu einer signifikanten Zytotoxizität mit einer Reduktion des relativen Zellwachstums um 60% an Tag 7 ($p = 0,021$) und 65% an Tag 10 ($p = 0,033$).

Von Matthias Sommer (AG Smola) wurde im Rahmen seiner Promotion zusätzlich der Effekt des selektiven CDK1-, CDK2- und CDK5-Inhibitors Roscovitine auf die Replikation des Dunlop und WWM12 getestet. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten im Vergleich zu den Effekten von Ro-3306 deutlich schwächere Effekte auf das Zellwachstum, aber auch deutlich schwächere inhibitorische Effekte auf die virale Replikation beider Stämme in vergleichbaren Konzentrationen (siehe Doktorarbeit Matthias Sommer).

5.7.3 Der WWM12-Stamm kann RPTEC nicht transformieren

Eine Fehlregulation des Zellzyklus kann zu einer unkontrollierten Zellteilung und damit zur Transformation der betroffenen Zelle und zur Tumorentstehung im Organismus führen. Zur Untersuchung, ob die durch die BKPyV-Infektion bedingte Induktion der positiven Zellzyklusregulatoren zu einer Transformation der infizierten RPTEC führen kann, wurde ein Transformationsassay in Agarose durchgeführt. Dazu wurden RPTEC mit dem WWM12-Stamm infiziert und nach einer Woche abgelöst, vereinzelt und in *low-melting* Agarose eingebettet. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass die Zellen keinen Kontakt zu Nachbarzellen haben, der für ein Zellwachstum nicht-transformierter Zellen wichtig ist. Durch das Einbetten in Agarose ist es nur transformierten Zellen mit einer Fehlregulation des Zellzyklus möglich, sich zu teilen. Dabei entstehen über den Verlauf des Experiments Kolonien von Zellen, die aus je einer transformierten Zelle hervorgegangen sind. Durch eine Färbung der Zellen mit Kristallviolett wurden die Zellkolonien nach drei Wochen sichtbar gemacht und anschließend fotografiert. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 20 dargestellt.

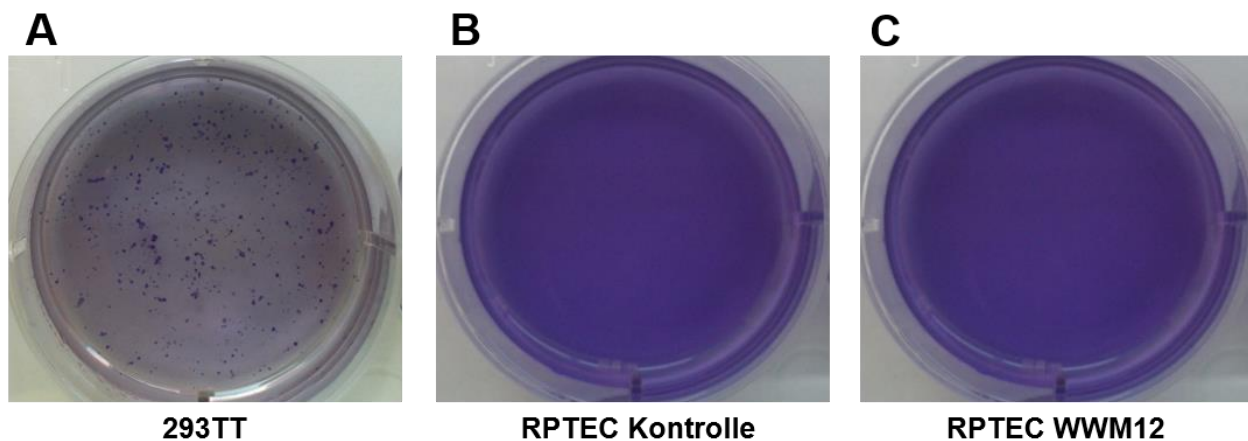


Abbildung 20: Transformationsassay von RPTEC.

Zellen wurden infiziert und eine Woche nach der Infektion in *low-melting* Agarose eingebettet. Nach drei Wochen in der Agarose wurden die Zellen mit Hilfe von Kristallviolett gefärbt und die Wells makroskopisch fotografiert. Verwendet wurden 293TT Zellen als Positivkontrolle (A), sowie nicht infizierte (B) und WWM12 infizierte (C) RPTEC. Dieser Versuch wurde zweimalig durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse eines Versuchs. Die Ergebnisse des zweiten Versuchs waren zu diesem identisch.

Da es sich bei 293TT Zellen um eine immortalisierte Zelllinie handelt, wurden diese als Positivkontrolle in diesem Versuch verwendet. Wie bei der Kristallviolett-Färbung der 293TT Zellen (Abbildung 20A) zu sehen ist, bildeten sich über den Verlauf des Experiments aus den vereinzelt 293TT Zellen einzelne, makroskopisch sichtbare Zellkolonien, was durch die Transformation bedingt ist. Sowohl bei den nicht infizierten RPTEC als Negativkontrolle (Abbildung 20B), als auch den WWM12 infizierten RPTEC (Abbildung 20C) konnte keine solche Kolonienbildung beobachtet werden. Das bedeutet, dass der WWM12 Stamm des BKPyV trotz der Induktion positiver Zellzyklusregulatoren in diesem System nicht in der Lage ist, die RPTEC zu transformieren.

5.8 Der Effekt der Retinoide auf die Replikation des BKPyV

5.8.1 ATRA inhibiert die Replikation des WWM12-Stamms

Zunächst wurde die Wirkung von ATRA, eines Retinoids der ersten Generation, auf die Replikation archetypischer BKPyV getestet. Zur Untersuchung von Effekten durch ATRA auf das Zellwachstum wurden nach sieben und 10 Tagen mikroskopische Fotos der behandelten Zellen aufgenommen (Abbildung 21). Durch eine Behandlung der Zellen mit einer 10 μ M ATRA-Konzentration im Zellkulturmedium wurde nach sieben Tagen eine um 55% reduzierte Viruslast ($p = 0,136$) im Überstand gemessen, nach 10 Tagen betrug die Reduktion der Viruslast 58% ($p = 0,953$) (Abbildung 21A). Nach der Behandlung der Zellen mit 20 μ M ATRA konnte eine signifikant verringerte Viruslast gemessen werden. Nach sieben Tagen lag die Viruslast der mit ATRA behandelten Zellen 78% unter dem Wert der DMSO-Kontrolle ($p = 0,047$), nach 10 Tagen war sie um 69% niedriger als in der Kontrolle ($p = 0,04$). Auf das Zellwachstum konnten durch ATRA auf

mikroskopischer Ebene keine auffälligen Unterschiede nachgewiesen werden (Abbildung 21B). Sowohl nach sieben, als auch nach 10 Tagen konnten durch die Behandlung mit 20 μM ATRA nur schwache inhibitorischen Effekte auf das Wachstum der RPTEC im Vergleich zur DMSO-Kontrolle beobachtet werden.

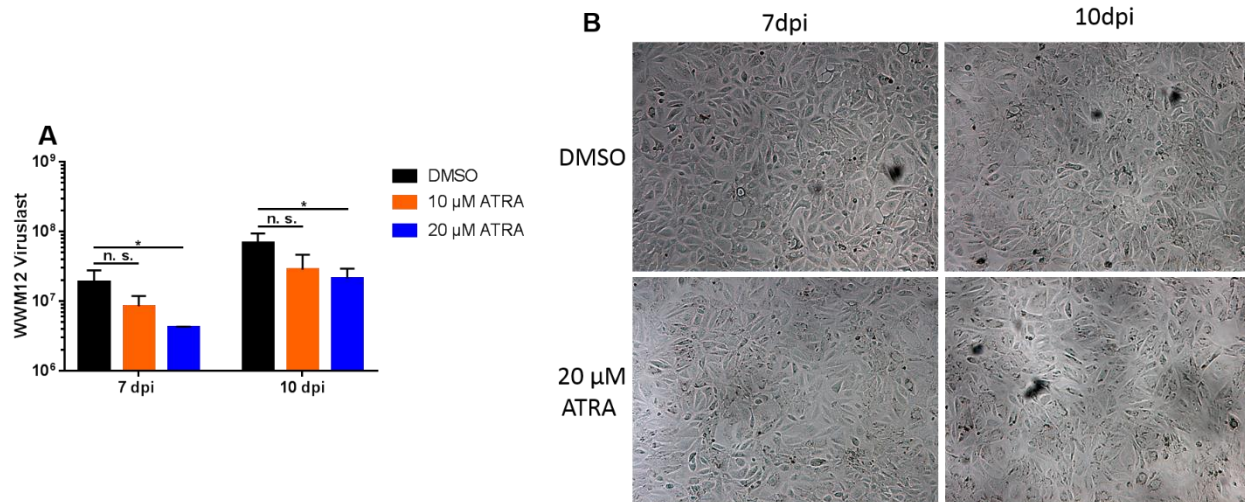


Abbildung 21: Effekt von ATRA auf die Replikation des BKPyV und das Wachstum der RPTEC.

(A) Absolute Viruslast im Zellkulturüberstand WWM12 infizierter und mit 10 μM oder 20 μM ATRA behandelter RPTEC. Als Kontrolle dienten infizierte und mit DMSO behandelte Zellen. **(B)** Mikroskopische Aufnahmen der infizierten und mit DMSO bzw. 20 μM ATRA behandelten Zellen nach sieben und 10 Tagen. n. s. = nicht signifikant, * $p < 0,05$.

5.8.2 Acitretin inhibiert die Replikation des WWM12-Stamms

Bei Acitretin handelt es sich um ein synthetisches Retinoid der zweiten Generation, das zur systemischen Behandlung von verschiedenen Hautkrankheiten zugelassen ist (Khalil et al., 2017). Darüber hinaus wurde es bereits erfolgreich gegen maligne Hautveränderungen in Nierentransplantierten eingesetzt (Yuan et al., 1995; Carneiro et al., 2005). In dieser Arbeit wurde Acitretin gegen die Replikation sowohl des Dunlop- als auch des WWM12-Stamms des BKPyV getestet. Potenzielle Effekte von Acitretin auf das RPTEC-Wachstum wurden mittels Neutralrot-Test untersucht (Abbildung 22).

Bei den Dunlop infizierten Zellen (Abbildung 22A) führte eine Behandlung mit 5 μM Acitretin nach 7 Tagen zu keiner Reduktion der Viruslast und nach 10 Tagen zu einer Reduktion um 23% ($p = 0,499$). Eine Behandlung dieser Zellen mit 10 μM Acitretin führte nach sieben Tagen ebenfalls zu keiner Veränderung der viralen Replikation, nach 10 zu einer Reduktion der Viruslast um 36% ($p = 0,353$). Durch 20 μM Acitretin konnte die nach sieben Tagen gemessene Viruslast der Dunlop infizierten Zellen um 32% ($p = 0,527$), nach 10 Tagen um 43% ($p = 0,224$) gesenkt werden. Ein signifikanter inhibitorischer Effekt von Acitretin auf die Dunlop Replikation konnte in diesem Versuch nicht nachgewiesen werden. Auf das Zellwachstum der infizierten Zellen hatte die Behandlung mit Acitretin keine auffälligen Effekte. Auffälligster Unterschied war ein an Tag 10

gemessenes um 16,5% ($p = 0,277$) höheres relatives Zellwachstum der mit 20 μM Acitretin behandelten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle.

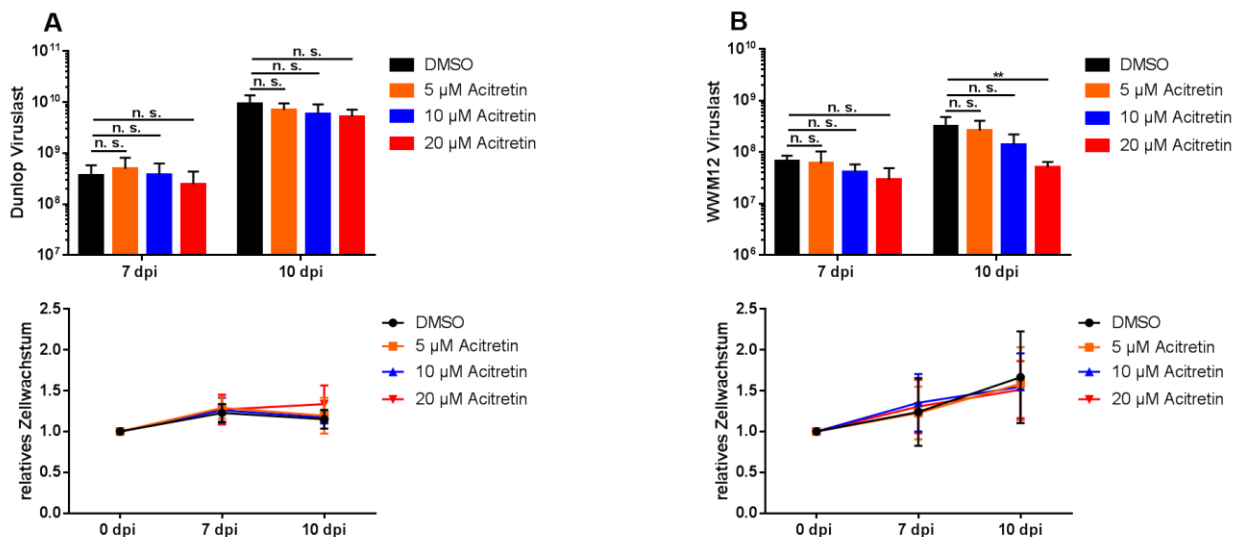


Abbildung 22: Effekt von Acitretin auf die Replikation des BKPyV und das Wachstum der RPTEC.

Absolute Viruslast im Zellkulturüberstand und relatives Zellwachstum von Dunlop (A) und WWM12 (B) infizierten und mit 5 μM , 10 μM oder 20 μM Acitretin-Konzentration behandelten Zellen. Als Kontrolle dienten infizierte und mit DMSO behandelte Zellen. Zur Berechnung des relativen Zellwachstums wurden die Werte des Neutralrot-Tests auf die Werte von Tag 0 (direkt nach der Infektion) normiert. n. s. = nicht signifikant, ** $p < 0,01$.

Bei den WWM12 infizierten Zellen (Abbildung 22B) konnte durch eine 5 μM Acitretin-Konzentration ebenfalls keine signifikant verringerte virale Replikation gemessen werden. Der WWM12 replizierte bis Tag 7 um 9% geringer ($p = 0,839$), zwischen Tag 7 und 10 um 20% geringer ($p = 0,696$). Bei der Behandlung WWM12 infizierter Zellen mit 10 μM Konzentration konnte nach sieben Tagen eine um 38% niedrigere Viruslast ($p = 0,168$) und nach 10 Tagen eine um 56% niedrigere Viruslast ($p = 0,168$) im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Innerhalb der ersten sieben Tage nach der Infektion konnte die virale Replikation durch eine 20 μM Acitretin-Konzentration zu 56% ($p = 0,61$) und zwischen Tag 7 und 10 signifikant zu 84% ($p = 0,005$) inhibiert werden. Signifikante Effekte auf das Zellwachstum der mit Acitretin behandelten Zellen wurden nicht gemessen.

5.8.3 Adapalen inhibiert die Replikation des WWM12-Stamms stark

Neben Retinoiden der ersten und zweiten Generation wurden ebenfalls Retinoide der dritten Generation getestet, die sich allgemein durch eine höhere Rezeptorselektivität und dadurch im Patienten oft durch geringere Nebenwirkungen auszeichnen (Uray et al., 2016). Getestet wurde die Wirkung von Adapalen auf die Replikation des WWM12-Stamms des BKPyV (Abbildung 23). Bei Adapalen handelt es sich um ein zurzeit nur zur topischen Anwendung zugelassenes Retinoid, das hauptsächlich zur Behandlung von Akne eingesetzt wird (Khalil et al., 2017).

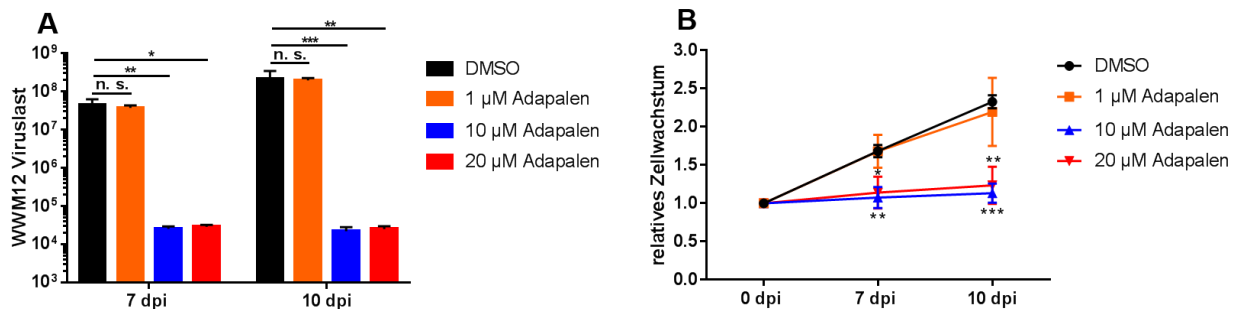


Abbildung 23: Effekt von Adapalenen auf die Replikation des BKPyV und das Wachstum der RPTEC.

(A) Absolute Viruslast im Zellkulturüberstand von WWM12 infizierten und mit 1 µM, 10 µM oder 20 µM Adapalenen-Konzentration behandelten Zellen. **(B)** Relatives Zellwachstum der infizierten und behandelten RPTEC. Als Kontrolle dienten infizierte und mit DMSO behandelte Zellen. Zur Berechnung des relativen Zellwachstums wurden die Werte des Neutralrot-Tests auf die Werte von Tag 0 (direkt nach der Infektion) normiert. n. s. = nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Die Behandlung der infizierten Zellen mit 1 µM Adapalenen resultierte an Tag 7 in einer um 16% im Vergleich zur Kontrolle geringeren Viruslast ($p = 0,981$), an Tag 10 konnte eine um 8% reduzierte Viruslast der infizierten und behandelten Zellen gemessen werden ($p = 0,637$) (Abbildung 23A). Eine auf 10 µM erhöhte Adapalenen-Konzentration führte bei den infizierten Zellen zu einer kompletten Inhibition der viralen Replikation, die sowohl an Tag 7 ($p = 0,0028$), als auch an Tag 10 nachgewiesen wurde ($p = 0,00017$). Auch eine auf 20 µM erhöhte Konzentration inhibierte die virale Replikation in den ersten sieben Tagen ($p = 0,0095$), sowie zwischen Tag 7 und 10 ($p = 0,0025$) komplett. Eine 1 µM Adapalenen-Konzentration im Zellkulturmedium hatte keinen signifikanten Effekt auf das Zellwachstum (Abbildung 23B). Das relative Zellwachstum der behandelten Zellen gemessen an Tag 7 nach der Infektion war mit dem der Kontrollzellen fast identisch ($p = 0,981$). An Tag 10 wurden bei den behandelten Zellen durchschnittlich um 5,6% geringere Werte ($p = 0,637$) gemessen. Eine Adapalenen-Konzentration von 10 bzw. 20 µM führte zu einer signifikanten Inhibition des Zellwachstums. Die relative Zellzahl der mit 10 µM behandelten Zellen war an Tag 7 um 36% geringer ($p = 0,028$), an Tag 10 um 52% geringer ($p = 0,00017$) als die der DMSO Kontrolle. Die relative Zellzahl der mit 20 µM behandelten infizierten Zellen war an Tag 7 im Vergleich zur Kontrolle um 32% ($p = 0,0139$), an Tag 10 um 47% verringert ($p = 0,0018$). Trotz dieser signifikanten inhibitorischen Effekte höherer Adapalenen-Konzentrationen ist aufgrund des Kurvenverlaufs der relativen Zellzahl nicht von einer zytotoxischen, sondern zytostatischen Wirkung von Adapalenen auszugehen. Die Zellzahl sank im Laufe der Experimente zu keinem Zeitpunkt unter das Ausgangsniveau.

5.8.4 Bexaroten inhibiert die Replikation beider Stämme stark

Ein weiteres Retinoid der dritten Generation, welches im Vergleich zu Adapalenen eine systemische Zulassung zur Behandlung von kutanen T-Zell-Lymphomen hat, ist Bexaroten. Im Vergleich zu

allen vorher getesteten Retinoiden handelt es sich bei Bexaroten um ein sogenanntes „Retinoid“, weil es einen selektiven Liganden für Retinoid-X-Rezeptoren mit einer schwächeren Bindeaktivität für andere Retinoidrezeptoren darstellt (Uray et al., 2016). Gegen die Dunlop-Replikation wurden 5 μM , 10 μM und 20 μM Bexaroten-Konzentrationen getestet (Abbildung 24). In den Infektionsexperimenten mit WWM12 wurde zusätzlich eine 40 μM Konzentration von Bexaroten getestet.

In Dunlop infizierten Zellen (Abbildung 24A) führte eine Behandlung mit 5 μM Bexaroten nach sieben Tagen zu einer um 21% verringerten viralen Replikation ($p = 0,625$), nach 10 Tagen wurde eine um 27% verringerte Viruslast ($p = 0,55$) gemessen. Eine signifikante Inhibition der viralen Replikation konnte durch Behandlung der Zellen mit einer 10 μM bzw. 20 μM Konzentration erreicht werden. Eine 10 μM Bexaroten-Konzentration führte sowohl an Tag 7 ($p = 0,048$), als auch an Tag 10 zu einer 80% geringeren ($p = 0,0085$) Viruslast im Überstand der Zellen. Eine Behandlung mit 20 μM Bexaroten reduzierte die Viruslast an Tag 7 um 93% ($p = 0,03$) und an Tag 10 um 96% ($p = 0,0045$). Es konnten keine Effekte von Bexaroten auf das Wachstum der infizierten RPTEC festgestellt werden.

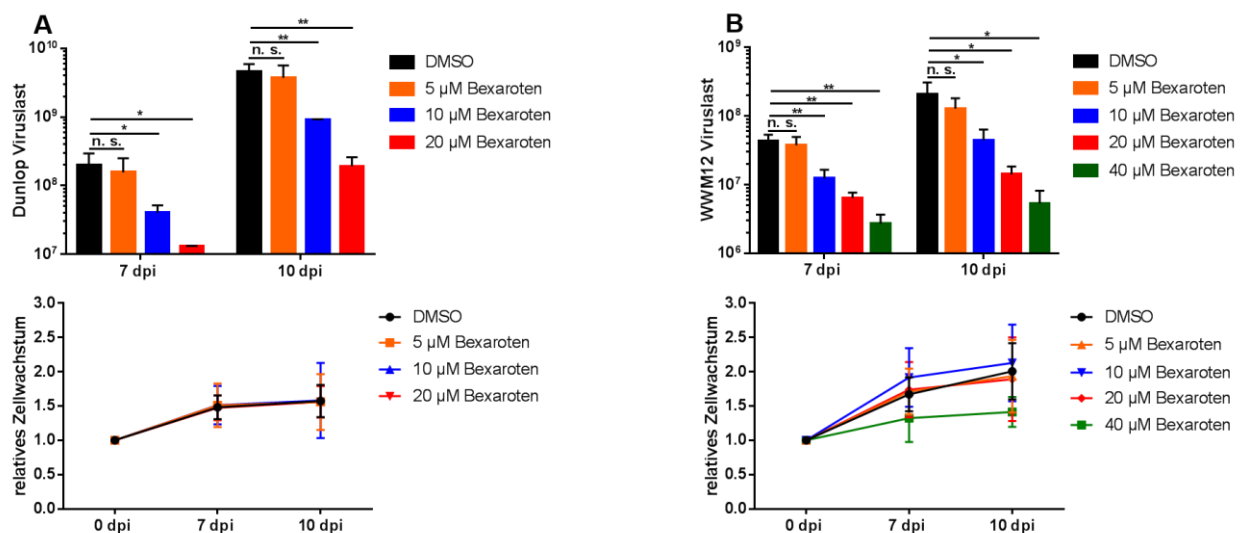


Abbildung 24: Effekt von Bexaroten auf die Replikation des BKPyV und das Wachstum der RPTEC.

Absolute Viruslast im Zellkulturüberstand und relatives Zellwachstum von Dunlop (A) und WWM12 (B) infizierten und mit 5 μM , 10 μM und 20 μM Bexaroten-Konzentration behandelten Zellen. Die WWM12 infizierten RPTEC wurden zusätzlich mit und 40 μM Bexaroten behandelt. Als Kontrolle dienten infizierte und mit DMSO behandelte Zellen. Zur Berechnung des relativen Zellwachstums wurden die Werte des Neutralrot-Tests auf die Werte von Tag 0 (direkt nach der Infektion) normiert. n. s. = nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Bei der Behandlung von WWM12 infizierten Zellen (Abbildung 24B) konnte mit einer 5 μM Bexaroten-Konzentration ebenfalls keine signifikante Reduktion der Viruslast erreicht werden. Nach sieben Tagen war die Viruslast um 14% ($p = 0,544$), nach 10 Tagen um 38% ($p = 0,293$) im

Vergleich zur Kontrolle gesenkt. Die Erhöhung der Konzentration auf 10 μM führte nach sieben Tagen zu einer 72% geringeren gemessenen Viruslast ($p = 0,0076$), nach 10 Tagen zu einer 79% geringeren Viruslast ($p = 0,0499$). Durch eine 20 μM Bexaroten-Konzentration konnte der Effekt auf eine Inhibition von 85% der viralen Replikation an Tag 7 ($p = 0,0031$) und auf eine 93% geringere Viruslast an Tag 10 ($p = 0,0286$) gesteigert werden. Eine Behandlung der Zellen mit einer 40 μM Konzentration führte an Tag 7 zu einer Reduktion der Viruslast um 94% ($p = 0,0021$) und an Tag 10 zu einer Reduktion um 97% ($p = 0,025$). Im Bezug auf das Zellwachstum konnte nur bei der Behandlung mit 40 μM Bexaroten ein nicht signifikanter zytostatischer Effekt nachgewiesen werden. Die nach sieben Tagen gemessenen Werte des relativen Zellwachstums lagen bei den mit Bexaroten behandelten Zellen um 21% ($p = 0,234$) und nach 10 Tagen um 30% niedriger ($p = 0,092$) als die der DMSO-Kontrolle. Niedrigere Bexaroten-Konzentrationen hatten keine negativen Effekte auf das Zellwachstum.

5.8.5 Fenretinid inhibiert die Replikation beider Stämme stark

Im nächsten Schritt wurde der Effekt von Fenretinid auf die BKPyV Replikation getestet. Im Gegensatz zum RXR-spezifischen Bexaroten hat Fenretinid eine hohe Spezifität für RAR- α und RAR- β (Fanjul et al. 1996). In klinischen Studien wird es zurzeit gegen verschiedene Krebsarten getestet (Cooper et al., 2017).

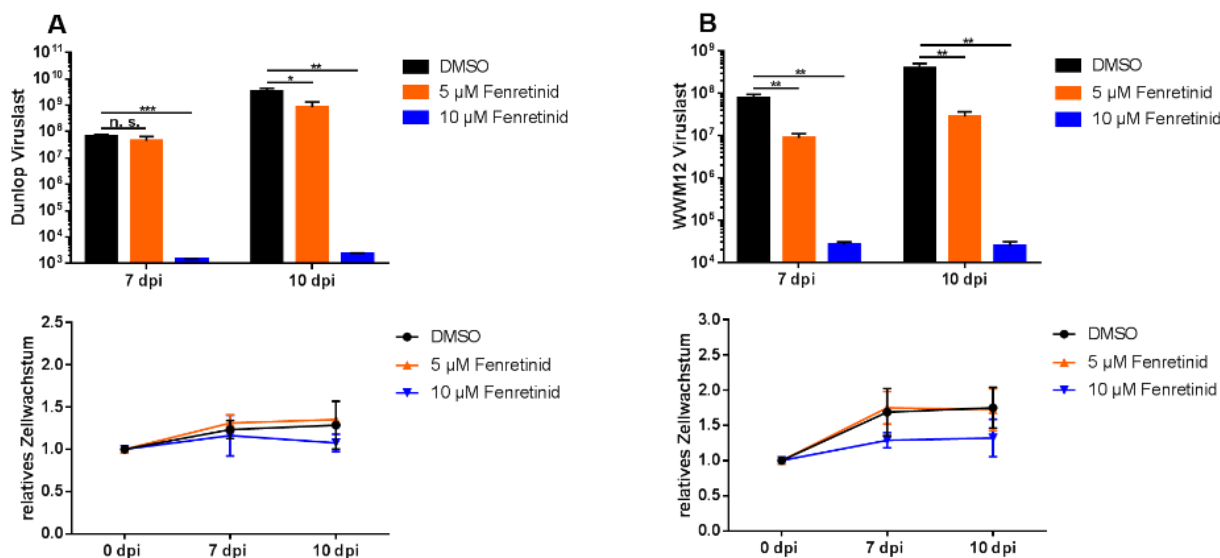


Abbildung 25: Effekt von Fenretinid auf die Replikation des BKPyV und das Wachstum der RPTEC.

Absolute Viruslast im Zellkulturüberstand und relatives Zellwachstum von Dunlop (A) und WWM12 (B) infizierten und mit 5 μM und 10 μM Fenretinid-Konzentration behandelten Zellen. Als Kontrolle dienten infizierte und mit DMSO behandelte Zellen. Zur Berechnung des relativen Zellwachstums wurden die Werte des Neutralrot-Tests auf die Werte von Tag 0 (direkt nach der Infektion) normiert. n. s. = nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

In einer 5 μM Konzentration führte Fenretinid in diesen Experimenten nach sieben Tagen zu einer 32% verringerten ($p = 0,202$) und nach 10 Tagen zu einer 73% verringerten ($p = 0,029$) Replikation des Dunlop (Abbildung 25A). Eine Behandlung der infizierten Zellen mit 10 μM Konzentration führte sowohl nach sieben Tagen ($p = 0,00056$), als auch nach 10 Tagen ($p = 0,008$) zu einer kompletten Inhibition der Dunlop-Replikation. Beim Vergleich des Zellwachstums der verschiedenen Ansätze konnte nur bei einer 10 μM Fenretinid-Konzentration ein im Vergleich zu den DMSO behandelten Zellen leicht, nicht signifikant verringertes Zellwachstum gemessen werden. Nach sieben Tagen betrug dieser Unterschied 5,7% ($p = 0,668$), nach 10 Tagen 16% ($p = 0,293$). Auf die Replikation des WWM12 hatte Fenretinid in diesen Versuchen in einer 5 μM Konzentration im Vergleich zu den Dunlop infizierten Zellen einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf die virale Replikation (Abbildung 25B). An Tag 7 nach der Infektion war die Viruslast der mit 5 μM Fenretinid behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle um 89% niedriger ($p = 0,0032$). An Tag 10 lag die Viruslast um 93% niedriger ($p = 0,0075$) als bei der Kontrolle. Ebenso wie bei den Dunlop infizierten Zellen führte eine Behandlung mit 10 μM sowohl an Tag 7 ($p = 0,002$), als auch an Tag 10 ($p = 0,0057$) zu einer kompletten Inhibition der viralen Replikation. Ein Effekt der 5 μM Fenretinid-Konzentration auf das Zellwachstum konnte mittels Neutralrot-Test nicht gemessen werden. Eine 10 μM Fenretinid-Konzentration führte an Tag 7 zu einer 24% verringerten ($p = 0,121$) und an Tag 10 zu einer um 25% verringerten ($p = 0,131$) relativen Zellzahl der behandelten Zellen.

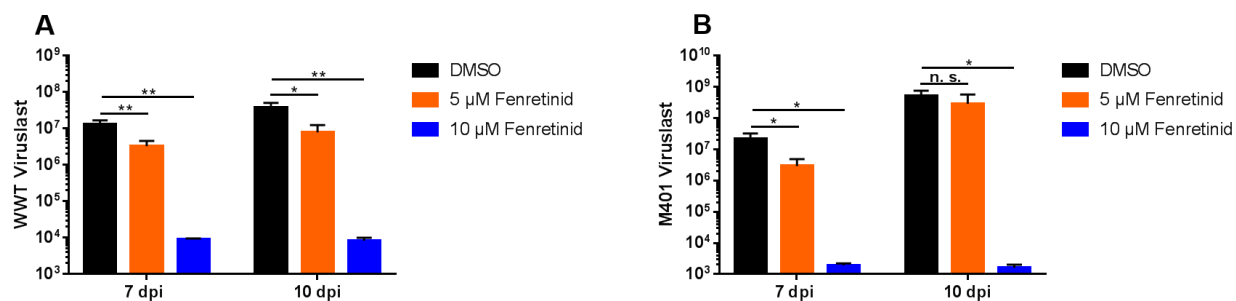


Abbildung 26: Effekt von Fenretinid auf die Replikation des WWT und M401-Stamms.

Absolute Viruslast im Zellkulturüberstand von WWT (A) und M401 (B) infizierten und mit 5 μM und 10 μM Fenretinid-Konzentration behandelten Zellen. Als Kontrolle dienten infizierte und mit DMSO behandelte Zellen. n. s. = nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Zur Untersuchung einer möglichen Abhängigkeit des Effektes von Fenretinid vom verwendeten BKPvV-Stamm wurde zusätzlich eine Behandlung WWT und M401 infizierter RPTEC mit 5 μM und 10 μM Fenretinid durchgeführt (Abbildung 26). Dabei konnten ähnliche Effekte wie bei der Behandlung WWM12 und Dunlop infizierter Zellen nachgewiesen werden. Eine Behandlung WWT infizierter Zellen (Abbildung 26A) mit 5 μM Fenretinid führte an Tag 7 zu einer um 75% verringerten ($p = 0,0093$) und an Tag 10 zu einer um 79% verringerten Viruslast ($p = 0,022$) im Vergleich zur

Kontrolle. Eine 10 μM Konzentration führte wie bei den bereits beschriebenen Stämmen zu einer kompletten Unterdrückung der viralen Replikation an Tag 7 ($p = 0,0025$) und an Tag 10 ($p = 0,0081$). Bei der Behandlung M401 infizierter Zellen (Abbildung 26B) mit 5 μM Fenretinid konnte nach sieben Tagen eine um 86% verringerte Viruslast ($p = 0,045$) der mit Fenretinid behandelten Zellen, nach 10 Tagen eine nicht signifikante um 44% verringerte Viruslast ($p = 0,343$) gemessen werden. Ebenso wie bei den anderen beschriebenen Stämmen wurde die M401 Replikation durch eine 10 μM an Tag 7 ($p = 0,028$) und Tag 10 ($p = 0,02$) vollständig unterdrückt. Eine Abhängigkeit der Wirkung von Fenretinid vom verwendeten Stamm konnte durch diese Experimente nicht nachgewiesen werden.

5.8.6 Abhängigkeit der Wirkung von Bexaroten und Fenretinid vom Applikationszeitpunkt

In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob die Wirkung von Bexaroten und Fenretinid abhängig vom Applikationszeitpunkt ist. Dafür wurden RPTEC entsprechend der anderen Versuche mit Dunlop oder WWM12 infiziert und die Medikamente entweder direkt nach der Infektion (nach zwei Stunden), nach acht Stunden, 24 Stunden, 72 Stunden oder fünf Tagen gegeben. Nach 10 Tagen wurden die Überstände der Zellen abgenommen und die Viruslast bestimmt. Bexaroten wurde in einer 20 μM Konzentration verwendet, Fenretinid in einer 10 μM Konzentration. Zu jedem Applikationszeitpunkt wurde zusätzlich eine Kontroll-Behandlung mit DMSO durchgeführt.

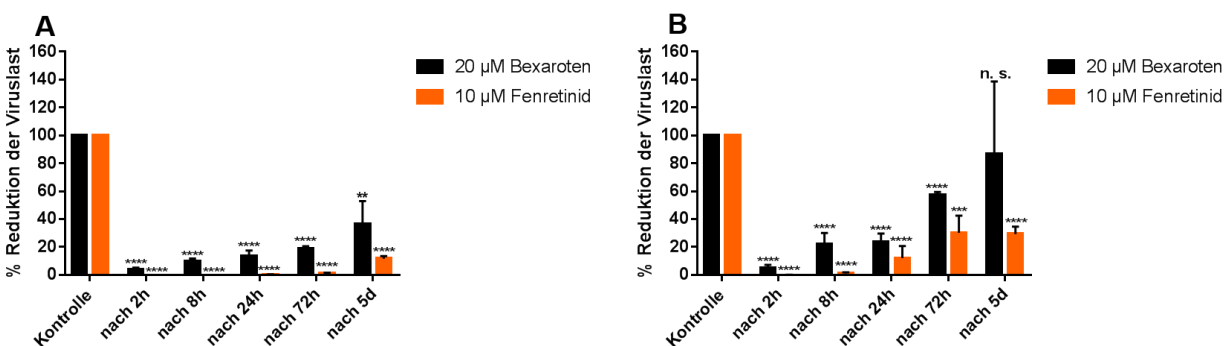


Abbildung 27: Kinetik des Effekts von Bexaroten und Fenretinid auf die Replikation des BKPyV.

Absolute Viruslast im Zellkulturüberstand von Dunlop (A) und WWM12 (B) infizierten und mit 20 μM Bexaroten oder 10 μM Fenretinid behandelten Zellen 10 Tage nach der Infektion. Appliziert wurden die Medikamente entweder direkt nach der Infektion (nach etwa 2 Stunden), 8 Stunden, 24 Stunden, 72 Stunden oder 5 Tage nach der Infektion. Als Kontrolle dienen infizierte und zu den jeweiligen Zeitpunkten mit DMSO behandelte Zellen. n. s. = nicht signifikant, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

Bei den Dunlop infizierten Zellen (Abbildung 27A) führte eine Applikation von Bexaroten direkt nach der Infektion zu einer Reduktion der Viruslast um 96% ($p < 0,0001$), eine Applikation nach acht Stunden resultierte nach 10 Tagen in einer um 90% ($p < 0,0001$) geringeren Viruslast. Bei einer Bexaroten-Gabe 24 Stunden nach der Infektion wurde eine Reduktion der Viruslast um 86%

($p < 0,0001$), gemessen. Die Behandlung mit Bexaroten nach 72 Stunden führte zu einer um 81% ($p < 0,0001$), die Behandlung nach fünf Tagen zu einer 64% ($p = 0,0026$) verringerten Replikation des Dunlop. Die Behandlung der infizierten Zellen mit Fenretinid nach zwei, acht und 24 Stunden führte zu einer mehr als 99% Inhibition der viralen Replikation ($p < 0,0001$). Wurde Fenretinid nach 72 Stunden appliziert, konnte die an Tag 10 gemessene Viruslast um 99% gesenkt werden, bei der Behandlung nach fünf Tagen war die Viruslast an Tag 10 um 88% ($p < 0,0001$) reduziert.

In WWM12 infizierten Zellen (Abbildung 27B) führte eine Behandlung mit Bexaroten direkt nach der Infektion zu einer 95% Inhibition ($p < 0,0001$) der viralen Replikation, bei einer Behandlung nach acht Stunden konnte eine 88% Inhibition Replikation erreicht werden ($p < 0,0001$). Bei einer Applikation von Bexaroten 24 Stunden nach der Infektion war die Viruslast nach Tag 10 um 86% niedriger als bei der Kontrolle, bei einer Applikation nach 72 um 43% ($p < 0,0001$) niedriger. Eine Gabe von Bexaroten nach fünf Tagen führte zu einer nicht signifikanten Reduktion der viralen Replikation um 14% ($p = 0,676$). Die Behandlung der WWM12 infizierten RPTEC mit Fenretinid direkt nach der Infektion führte zu einer kompletten Inhibition der Replikation ($p < 0,0001$), die Behandlung nach acht Stunden zu einer 99% Inhibition der Replikation. Bei einer Applikation von Fenretinid nach 24 Stunden wurden eine um 88% reduzierte Viruslast ($p < 0,0001$), bei einer Applikation nach 72 Stunden eine um 70% reduzierte Viruslast ($p = 0,0006$) gemessen. Wurden die Zellen nach fünf Tagen mit Fenretinid behandelt, konnte die virale Replikation um 71% reduziert werden ($p < 0,0001$).

5.9 Der Einfluss von Bexaroten und Fenretinid auf die Expression von Cyclin E und CDK1/2

Zur Untersuchung potenzieller Wirkmechanismen inhibitorischen Wirkung der Retinoide auf die Replikation des BKPyV wurde der Einfluss von Bexaroten und Fenretinid auf die mRNA-Expression von Cyclin E1 und E2, sowie CDK1 und CDK2 untersucht. Verwendet wurden Dunlop und WWM12 infizierte, sowie nicht-infizierte Zellen und die Expression wurde nach jeweils sieben und 10 Tagen gemessen. Die Werte der qRT-PCR wurden auf die nicht-infizierte DMSO-behandelte Kontrolle des jeweiligen Zeitpunktes normiert.

5.9.1 Dunlop-infizierte Zellen

Der Effekt der Retinoide auf die Genexpression in Dunlop infizierten Zellen ist in Abbildung 28 dargestellt. Auf die Expression von Cyclin E1 konnte durch 20 μ M Bexaroten nach sieben Tagen sowohl in infizierten, als auch uninfizierten Zellen kein signifikanter inhibitorischer Effekt nachgewiesen werden (Abbildung 28A). In der Kontrolle nach 10 Tagen konnte sogar eine leichte, nicht signifikante Zunahme der Cyclin E1-Expression um etwa 14% ($p = 0,569$) in Bexaroten

behandelten Zellen gemessen werden. In infizierten Zellen konnte bei den DMSO behandelten Zellen ein Anstieg der Cyclin E1-Expression um das 5-Fache gemessen werden. In Bexaroten behandelten und infizierten Zellen konnte dagegen nur ein Anstieg um das 1,5-Fache gemessen werden, was im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ein signifikanter Rückgang um 71% bedeutet ($p = 0,0079$). Die Behandlung mit 10 μM Fenretinid führte in nicht-infizierten Zellen nach sieben Tagen zu einer um 33% ($p = 0,141$) verringerten, nach 10 Tagen zu einer um 3% verringerten Cyclin E1-Expression ($p = 0,057$). Aufgrund des nur schwachen Effekts des Dunlop auf die Cyclin E1-Expression nach sieben Tagen (Induktion um 22%), war auch der Fenretinid-Effekt mit einer Reduktion um 37% ($p = 0,94$) ähnlich dem in den uninifizierten Zellen. Im Vergleich zur infizierten Kontrolle an Tag 10 konnte eine signifikante um 80% unterdrückte Genexpression ($p = 0,0034$) auf etwa dem Niveau der nicht-infizierten Kontrolle gemessen werden.

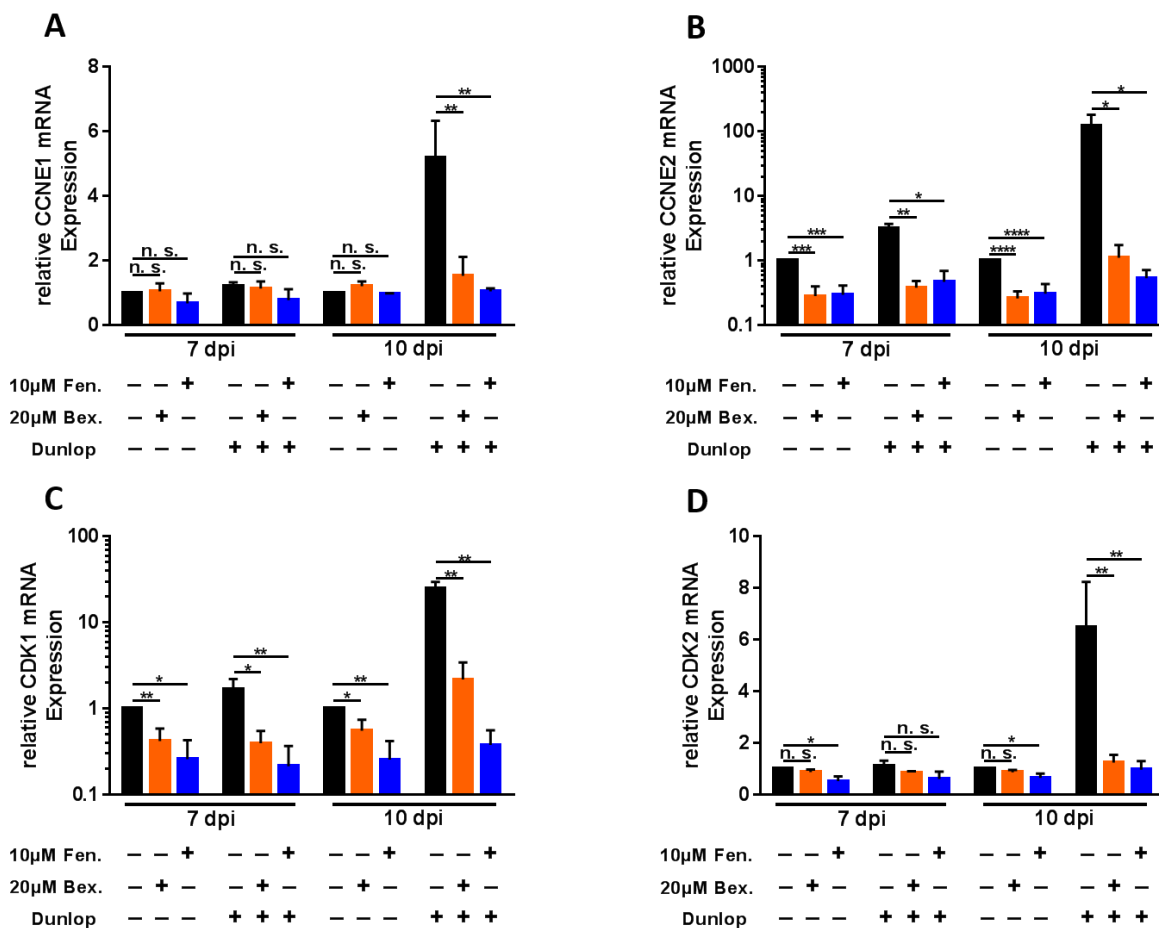


Abbildung 28: Einfluss von Bexaroten und Fenretinid auf die Expression von Cyclin E1, E2, CDK1 und CDK2 in Dunlop infizierten Zellen.

Relative mRNA-Expression von CCNE1 (A), CCNE2 (B), CDK1 (C) und CDK2 (D) in mit Dunlop infizierten RPTEC 7 und 10 Tage nach der Infektion. Als Kontrollen wurden jeweils uninifizierte und mit DMSO behandelte Zellen, bzw. infizierte und mit DMSO behandelte Zellen verwendet. Die Werte wurden auf die nicht infizierte und DMSO behandelte Kontrolle normiert. Bei der statistischen Auswertung wurden die Expressionswerte der mit Retinoiden behandelten Zellen jeweils auf die uninifizierte oder infizierte DMSO-Kontrolle bezogen. n. s. = nicht signifikant, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Im Vergleich dazu konnte ein hochsignifikanter Effekt sowohl von Bexaroten, als auch Fenretinid auf die Cyclin E2-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 28B). Nach sieben Tagen war die Cyclin E2-Expression in der nicht-infizierten Kontrolle durch Bexaroten um 72% ($p = 0,00043$) und durch Fenretinid um 70% ($0,00048$) verringert. An Tag 10 konnte in der Kontrolle eine Unterdrückung durch Bexaroten um 74% ($p < 0,0001$) und durch Fenretinid um 69% ($p < 0,0001$) gemessen werden. In infizierten und mit DMSO behandelten Zellen stieg die Cyclin E2-Expression nach sieben Tagen im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle um das 3,6-Fache an, nach 10 Tagen um das 121-Fache. Dieser Anstieg konnte durch Bexaroten und Fenretinid fast vollständig neutralisiert werden. Die Behandlung mit Bexaroten senkte die Cyclin E2-Expression an Tag 7 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle komplett und lag noch um 62% ($p = 0,0011$) unter dem Niveau der nicht infizierten Kontrolle. Bei den Fenretinid behandelten Zellen lag dieser Wert bei 43% ($p = 0,016$). An Tag 10 führte Bexaroten ebenfalls zu einer fast kompletten Inhibition der Cyclin E2-Induktion durch Dunlop ($p = 0,034$). Die gemessenen Werte lagen durchschnittlich nur 10% über den Werten der nicht-infizierten Kontrolle. Ein stärkerer Effekt konnte bei mit Fenretinid behandelten Zellen nachgewiesen werden. Fenretinid inhibierte die Induktion der Cyclin E2-Induktion komplett ($p = 0,033$) und senkte die Expression sogar 47% unter die Basalexpression in nicht-infizierten Zellen.

Auch auf die Expression von CDK1 konnte ein signifikanter Effekt der Retinoide beobachtet werden (Abbildung 28C). Nach sieben Tagen war die mRNA-Expression von CDK1 in nicht infizierten Zellen durch Bexaroten um 58% ($p = 0,0038$) und durch Fenretinid um 74% ($p = 0,017$) reduziert. Nach 10 Tagen resultierte die Behandlung mit Bexaroten in einer um 45% ($p = 0,015$) und die Behandlung mit Fenretinid in einer Reduktion der CDK1-Expression um 74% ($p = 0,0014$). Die Dunlop-Infektion führte nach sieben Tagen zu einer um 68% erhöhten CDK1 Expression, nach 10 Tagen zu einer 25-fach erhöhten CDK1-Expression. Nach sieben Tagen konnte die Dunlop-vermittelte Induktion der Expression durch Bexaroten um 76% ($p = 0,016$) verringert werden, durch Fenretinid um 87% ($p = 0,0014$). Bei den mit Bexaroten behandelten Zellen lag der Wert damit um 60%, bei den mit Fenretinid behandelten Zellen um 79% unter der Basalexpression in der nicht-infizierten DMSO-Kontrolle. Nach 10 Tagen wurde die Expression von CDK1 in infizierten Zellen durch Bexaroten um 91% ($p = 0,0029$), durch Fenretinid komplett ($p = 0,0019$) reduziert. Der Wert der Bexaroten behandelten Zellen lag um das 2-Fach über der basalen CDK1 Expression in den uninifizierten Zellen, der Wert der Fenretinid behandelten Zellen lag 62% unter dem der Kontrolle.

Die Expression von CDK2 wurde durch Bexaroten und Fenretinid im Vergleich dazu schwächer unterdrückt. In uninifizierten Zellen wurde die Expression von CDK2 durch Bexaroten nach sieben

Tagen nicht signifikant um 22% ($p = 0,095$), durch Fenretinid signifikant um 47% ($p = 0,012$) unterdrückt (Abbildung 28D). Nach 10 Tagen führte die Behandlung mit Bexaroten zu einer Unterdrückung um 23% ($p = 0,069$), eine Behandlung mit Fenretinid zu einer Unterdrückung um 35% ($p = 0,024$). Durch die Dunlop-Infektion konnte an Tag 7 eine um 11% induzierte, an Tag 10 eine um 6,48-fach induzierte CDK2 Expression gemessen werden. Durch Bexaroten konnte diese Induktion in den infizierten Zellen an Tag 7 ($p = 0,136$) komplett inhibiert werden und der gemessene Wert der behandelten Zellen lag 13% unter dem Wert der nicht behandelten und nicht-infizierten Zellen. An Tag 10 konnte im Vergleich zur infizierten und nicht behandelten Kontrolle eine Reduktion der Expression um 87% erreicht werden ($p = 0,0071$), der Wert lag aber noch um 24% über der Expression in nicht infizierten und nicht behandelten Zellen. Durch die Behandlung mit Fenretinid konnte an beiden gemessenen Zeitpunkten eine komplette Inhibition der CDK2-Induktion durch Dunlop nachgewiesen werden. Die Reduktion der Expression lag nach sieben Tagen bei 44% im Vergleich zur infizierten DMSO-Kontrolle ($p = 0,069$) und bei 38% im Vergleich zur nicht infizierten DMSO-Kontrolle. Nach 10 Tagen lag die Reduktion der Expression der Fenretinid behandelten Zellen im Vergleich zur infizierten DMSO-Kontrolle bei 85% ($p = 0,006$), im Vergleich zur nicht infizierten DMSO-Kontrolle bei einer um 3% verringerten CDK2-Expression.

5.9.2 WWM12-infizierte Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses der Retinoide auf WWM12 infizierte Zellen (Abbildung 29) wurden ebenfalls nicht infizierte Kontrollen durchgeführt. Da diese von der experimentellen Vorgehensweise entsprechend denen in Abbildung 28 behandelt wurden, wird im Folgenden auf die Effekte der Retinoide auf diese Zellen nicht näher eingegangen. Mit geringen Abweichungen konnten bei diesen Experimenten dieselben Effekte wie in den bereits beschriebenen Experimenten in Abbildung 28 beobachtet werden.

Durch die Infektion mit WWM12 wurde die Cyclin E1-Expression nach sieben Tagen im Vergleich zur Kontrolle um 16%, nach 10 Tagen um 77% erhöht (Abbildung 29A). Durch die Behandlung mit Bexaroten konnte nach sieben Tagen im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle eine um 19% höhere Expression, im Vergleich zur infizierten Kontrolle eine um 2% erhöhte Expression ($p = 0,871$) gemessen werden. Nach 10 Tagen lag die CCNE1-Expression nach Bexaroten-Behandlung um 15% unter der der infizierten Zellen ($p = 0,396$) aber um 50% höher als in den nicht infizierten Zellen. Fenretinid war in der Lage die Induktion der Cyclin E1-Expression komplett zu inhibieren. Nach sieben Tagen konnte durch Fenretinid eine im Vergleich zur infizierten Kontrolle um 34% geringere Expression ($p = 0,032$), im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle eine um 23% geringere Expression nachgewiesen werden. Nach 10 Tagen konnte durch Fenretinid eine um 40% ($p = 0,005$) geringere Expression im Vergleich zur infizierten Kontrolle

gemessen werden. Im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle lag der gemessene Wert um 7% höher.

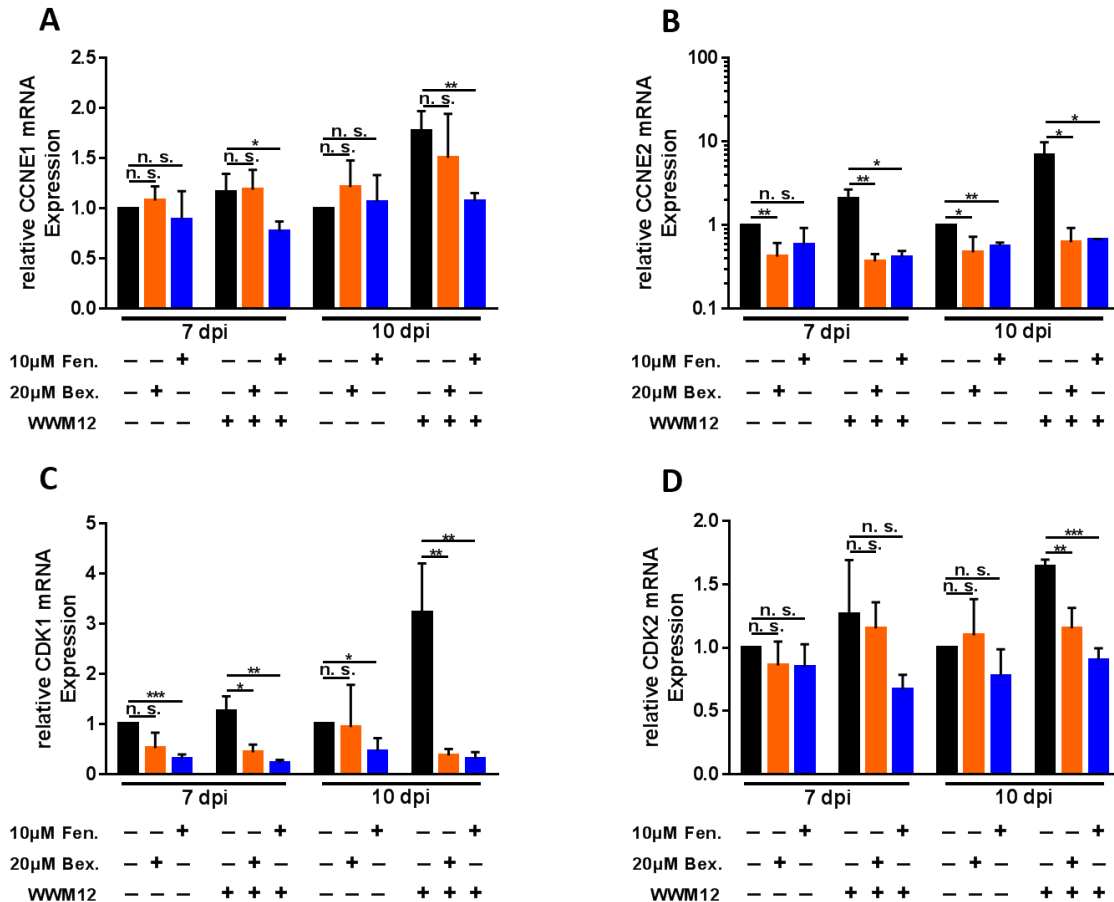


Abbildung 29: Einfluss von Bexaroten und Fenretinid auf die Expression von Cyclin E1, E2, CDK1 und CDK2 in WWM12 infizierten Zellen.

Relative mRNA-Expression von CCNE1 (A), CCNE2 (B), CDK1 (C) und CDK2 (D) in mit Dunlop infizierten RPTEC 7 und 10 Tage nach der Infektion. Als Kontrollen wurden jeweils uninferierte und mit DMSO behandelte Zellen, bzw. infizierte und mit DMSO behandelte Zellen verwendet. Die Werte wurden auf die nicht infizierte und DMSO behandelte Kontrolle normiert. Bei der statistischen Auswertung wurden die Expressionswerte der mit Retinoiden behandelten Zellen jeweils auf die uninferierte oder infizierte DMSO-Kontrolle bezogen. n. s. = nicht signifikant, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Ein inhibitorischer Effekt beider Retinoide auf die Expression von Cyclin E2 (Abbildung 29B) konnte ebenso wie in Dunlop infizierten, auch in WWM12 infizierten Zellen nachgewiesen werden. Die in infizierten Zellen nach sieben Tagen um das 2-Fache im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Cyclin E2-Expression konnte durch Bexaroten um 82% ($p = 0,0073$), durch Fenretinid um 80% ($p = 0,0079$) gesenkt werden. Dabei lag die Expression in den infizierten und mit Bexaroten und Fenretinid 63% bzw. 59% unter der Expression in nicht-infizierten und unbehandelten Zellen. Nach 10 Tagen wurde eine um etwa das 6,8-Fache durch die Infektion erhöhte Cyclin E2-Expression nachgewiesen. Durch Bexaroten und Fenretinid wurde diese Induktion um 91% ($p =$

0,0248) bzw. 90% ($p = 0,025$) und damit komplett inhibiert. Dabei sank die Expression durch Bexaroten im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle um 37%, durch Fenretinid um 33%.

Die Expression von CDK1 (Abbildung 29C) wurde durch die WWM12-Infektion in den ersten sieben Tagen um 26%, zwischen Tag 7 und 10 um etwa das 3-Fache induziert. Eine Behandlung der infizierten Zellen mit Bexaroten oder Fenretinid führte an Tag 7 zu einer Unterdrückung der CDK1-Expression um 65% ($p = 0,014$) bzw. 83% ($p = 0,0044$). Damit lag die Expression um 56% bzw. 78% unter der Expression in nicht infizierten und mit DMSO behandelten Zellen. Auch 10 Tage nach der Infektion wurde die Induktion der CDK1-Expression durch die Infektion sowohl durch Bexaroten (um 88%; $p = 0,0075$), als auch durch Fenretinid (um 91%, $p = 0,0069$) komplett inhibiert. Die in den mit Bexaroten bzw. Fenretinid behandelten Zellen gemessenen relativen Expressionswerte von CDK1 lagen im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle 62% bzw. 70% niedriger.

Nach sieben Tagen konnten bei der Messung der CDK2-Expression (Abbildung 29D) keine signifikanten Effekte durch Bexaroten oder Fenretinid nachgewiesen werden. Die Expression wurde durch die Infektion um 27% induziert und durch Bexaroten um 9% ($p = 0,07$), durch Fenretinid um 47% ($p = 0,08$) gesenkt. Im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle lag die Expression in Bexaroten-behandelten Zellen noch um 15% höher, in Fenretinid behandelten Zellen um 33% niedriger. Eine nach 10 Tagen um 64% erhöhte CDK2-Expression in infizierten Zellen konnte durch Bexaroten signifikant um 30% ($p = 0,0081$) und durch Fenretinid signifikant um 45% ($p = 0,0003$) inhibiert werden. Damit lag die in Bexaroten-behandelnden Zellen ähnlich wie an Tag 7 noch um 15% über der Basalexpression, in mit Fenretinid behandelten Zellen lag sie um 10% unter der Basalexpression der Kontrolle.

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Bexaroten und Fenretinid hauptsächlich auf die mRNA-Expression von Cyclin E2 und CDK1 einen signifikanten inhibitorischen Einfluss haben. Trotz dieser Effekte hatten die getesteten Retinoide in effektiven Konzentrationen einen nur sehr geringen negativen Einfluss auf das Zellwachstum. Daraus ist zu schließen, dass die Inhibition der Cyclin E2- und CDK1-Expression nicht (allein-)verantwortlich für die Inhibition des BKPyV sein kann.

5.10 Der Effekt von Bexaroten und Fenretinid auf die DNA-Bindeaktivität von AP-1

5.10.1 Die archetypische NCCR enthält potenzielle Bindestellen für AP-1

Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, scheint der Transkriptionsfaktor AP-1 bei der Genexpression des BKPyV eine wichtige Rolle zu spielen. Interessanterweise wurde eine AP-1 Bindung an die NCCR bisher noch nicht zweifelsfrei experimentell bewiesen (siehe Abschnitt 3.2.3.2). Zur Untersuchung der möglichen Bindung von AP-1 an die NCCR, sowie des Effekts von Bexaroten und Fenretinid auf eine mögliche AP-1 Bindung wurde mit Hilfe des Programms PROMO zunächst nach potenziellen Bindestellen für AP-1 in der NCCR des WWM12- und Dunlop-Stamms gesucht. Eine Übersicht über die vorhergesagten Bindestellen ist in Abbildung 30 dargestellt.

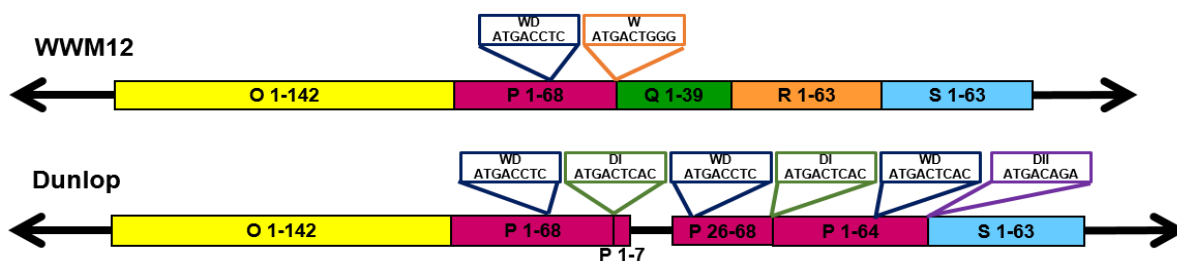


Abbildung 30: Vorausgesagte potenzielle Bindestellen für AP-1 in der NCCR von WWM12 und Dunlop.

Potenzielle Bindestellen für AP-1 in der NCCR des WWM12- und Dunlop-Stamms wurden mit Hilfe des Programms PROMO vorhergesagt.

In der NCCR von WWM12 wurden durch das Programm zwei potenzielle Bindestellen für AP-1 vorhergesagt. Eine potenzielle Bindestelle liegt im P-Block (WD) und kommt aufgrund der Duplikation des P-Blocks in der Dunlop-NCCR dreimal vor. Die Bindestelle W überspannt in der archetypischen NCCR den Übergang vom P-Block zum Q-Block. Durch die Deletion des Q-Blocks in der Dunlop NCCR kommt W im Dunlop nicht vor. Durch den Verlust des Q-Blocks entstand am Übergang des ersten in den zweiten P-Block in der Dunlop-NCCR eine neue potenzielle Bindestelle (DI), die in der archetypischen NCCR nicht vorkommt. An der Verbindungsstelle zwischen dem dritten P-Block und dem S-Block konnte im Dunlop ebenfalls eine potenzielle Bindestelle (DII) durch das Programm identifiziert werden.

5.10.2 Die untersuchten Bindestellen sind durch PMA-Stimulation induzierbar

Zur experimentellen Untersuchung dieser vorhergesagten AP-1 Bindestellen wurden EMSA durchgeführt. Dazu wurden die Bindestellen als Oligonukleotide synthetisiert, durch [γ - 32 P]-ATP radioaktiv markiert, mit Kernextrakten von RPTEC inkubiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Eine Verschiebung der radioaktiven Oligos auf dem Gel wurde auf Röntgenfilmen detektiert. Zunächst wurden die vier Bindestellen auf eine Induzierbarkeit durch PMA-Stimulation untersucht.

Dafür wurden die Zellen 24 Stunden vor der Extraktion der Kernproteine mit PMA stimuliert (Abbildung 31). Als Positivkontrolle wurde bei diesen Versuchen zusätzlich eine Konsensussequenz verwendet, also eine bereits als AP-1 Bindestelle identifizierte und veröffentlichte DNA-Sequenz.

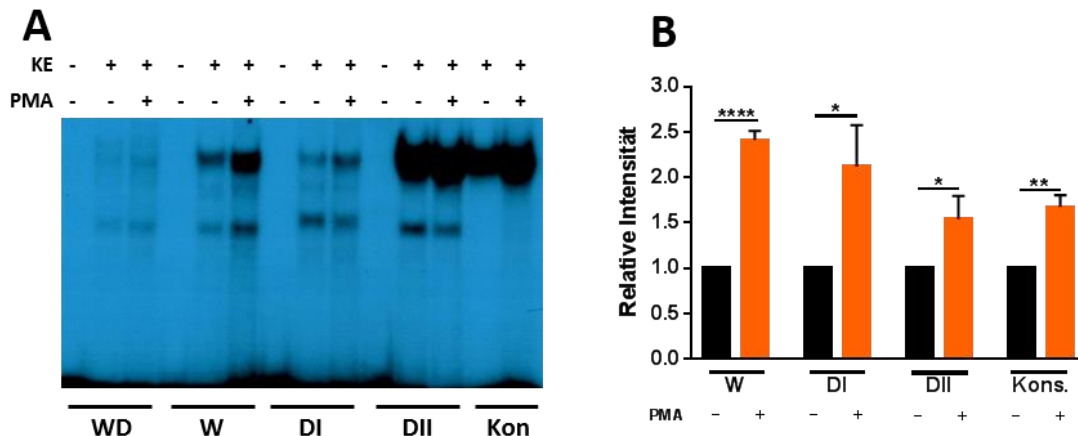


Abbildung 31: PMA-Induzierbarkeit der Proteinbindung an die Vorhergesagten DNA-Sequenzen.

RPTEC wurden für 24 Stunden mit PMA stimuliert und die Induzierbarkeit der Proteinbindung durch PMA an vier vorhergesagte AP-1 Bindestellen, sowie eine Konsensussequenz wurden mit Hilfe von EMSA untersucht (A). Die Intensitäten der detektierten Banden wurden densitometrisch quantifiziert (B). Zur Quantifizierung wurden die relativen gemessenen Intensitäten von drei unabhängigen Experimenten gemittelt und auf die unstimulierte Kontrolle normiert. Die Abbildung 31A zeigt ein repräsentatives Radiogramm dieser Versuche. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

Eine Induzierbarkeit der DNA-Bindung durch PMA konnte in diesen Experimenten bei allen untersuchten Bindestellen nachgewiesen werden (Abbildung 31A). Während die Proteinbindung an die Bindestellen WD und DI im Vergleich zur Konsensussequenz nur sehr schwach war, konnte eine stärkere Proteinbindung an die Bindestelle W nachgewiesen werden. Die Bindeaktivität der in der Dunlop-NCCR befindlichen Bindestelle DII war sogar stärker, als die der Konsensussequenz. Durch eine densitometrische Quantifizierung der detektierten Banden konnte für die Bindestelle W eine durchschnittlich 2,4-fach stärkere Bindung ($p < 0,0001$) nach PMA-Stimulation der Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 31B). Die Bindung an die Bindestelle DI konnte durch PMA um das 2,1-Fache erhöht werden ($p = 0,013$), die Bindung an DII um das 1,5-Fache ($p = 0,023$). Bei der Konsensussequenz führte die Stimulation der Zellen mit PMA zu einer 1,7-fach induzierten Proteinbindung. Eine Quantifizierung der Bindungsaktivität an die Bindestelle WD war aufgrund teilweise zu schwacher Signale nicht möglich. Aufgrund der sehr schwachen Bindeaktivität dieser Bindestelle und der von Bindestelle DI wurden für die folgenden Versuche nur noch die Bindestellen W und DII verwendet.

5.10.3 Bindestelle W ist in der BKPyV-NCCR konserviert

Die Bindestelle W konnte als erste Bindestelle für AP-1 in der archetypischen NCCR nachgewiesen werden. Zur Vorhersage dieser Bindestelle wurden aber in allen vorherigen Analysen ausschließlich die NCCR-Sequenzen des WWM12- und Dunlop-Stamms verwendet. Im nächsten Schritt wurden die NCCRs anderer archetypischer Stämme auf eine Existenz der Bindestelle W *in silico* untersucht. Untersucht wurden neben der Sequenz des WWT-Stamms ebenfalls die Sequenz des WWM2- (GenBank: JQ513593.1), WWM3- (GenBank: JQ513594.1), WWM5- (GenBank: JQ513596.1), WWM8- (GenBank: JQ513599.1), und WWM9-Archetyps (GenBank: JQ513600.1), die im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls im Urin von Patienten des UKS nachgewiesen werden konnten, aber nicht zur Virusanzucht verwendet wurden.

```

WWM12      TTTTGCAAAAATT-GCAAAAAGAATAGGGATTTCCCC-AAATATTTTGTAGGCCCTCAGA
WWM5       TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCC-AAATAGTTTGTAGGCCCTCAGA
WWT        TTTTGCAAAAATT-GCAAAAAGAATAGGGATTTCCCC-AAATAGTTTGTAGGCCCTCAGA
WWM2       TTTTGCAAAAATT-GCAAAAAGAATAGGGATTTCCCC-AAATAGTTTGTAGGCCCTCAGA
WWM8       TTTTGCAAAAATT-GCAAAAAGAATAGGGATTTCCCC-AAATAGTTTGTAGGCCCTCAGA
WWM9       TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCC-AAATAGTTTGTAGGCCCTCAGA
WWM3       TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCC-AAATAGTTTGTAGGCCCTCAGA
***** * *****

WWM12      AAAAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCT
WWM5       AAAAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCT
WWT        AAAAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCT
WWM2       AAAAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCT
WWM8       AAAAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCT
WWM9       AAAAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCT
WWM3       AAAAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCT
***** * *****

WWM12      CTTATATATTATAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCA
WWM5       CTTATATATTATAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCA
WWT        CTTATATATTATAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCA
WWM2       CTTATATATTATAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCA
WWM8       CTTATATATTATAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCA
WWM9       CTTATATATTATAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCA
WWM3       CTTATATATTATAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCA
***** * *****

WWM12      AACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCAATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGCCAGTTAATAGT
WWM5       AACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCAATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGCCAGTTAATAGT
WWT        AACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCAATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGCCAGTTAATAGT
WWM2       AACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCAATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGCCAGTTAATAGT
WWM8       AACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCAATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGCCAGTTAATAGT
WWM9       AACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCAATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGCCAGTTAATAGT
WWM3       AACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCAATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGCCAGTTAATAGT
***** * *****

WWM12      GAAACCCCGCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAAGTGGAAACTGGCCAAAGGA
WWM5       GAAACCCCGCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAAGTGGAAACTGGCCAAAGGA
WWT        GAAACCCCGCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAAGTGGAAACTGGCCAAAGGA
WWM2       GAAACCCCGCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAAGTGGAAACTGGCCAAAGGA
WWM8       GAAACCCCGCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAAGTGGAAACTGGCCAAAGGA
WWM9       GAAACCCCGCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAAGTGGAAACTGGCCAAAGGA
WWM3       GAAACCCCGCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAAGTGGAAACTGGCCAAAGGA
***** * *****

WWM12      GTGGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCAGT
WWM5       GTGGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCAGT
WWT        GTGGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCAGT
WWM2       GTGGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCAGT
WWM8       GTGGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCAGT
WWM9       GTGGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCAGT
WWM3       GTGGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCAGT
***** * *****

WWM12      TAA-ACTGGACAAAGGCC
WWM5       TAA-ACTGGACAAAGGCC
WWT        TAA-ACTGGACAAAGGCC
WWM2       TAA-ACTGGACAAAGGCC
WWM8       TAA-ACTGGACAAAGGCC
WWM9       TAA-ACTGGACAAAGGCC
WWM3       TAA-ACTGGACAAAGGCC
*****

```

Abbildung 32: Sequenzalignment der NCCR verschiedener archetypischer BKPyV-Stämme.

Die Punktmutationen im Vergleich zum WWM12-Stamm wurden rot markiert. Die Bindestelle WD wurde gelb, die Bindestelle W wurde grün markiert.

Durch einen Vergleich der NCCR aller genannten Stämme konnte eine Konservierung der Bindestelle W in der archetypischen NCCR nachgewiesen werden (Abbildung 32). Keine der im Vergleich zum WWM12-Stamm bestehenden Basenaustausche der untersuchten Stämme liegt im Bereich dieser Bindestelle. Die Bindestelle WD wurde in Abbildung 32 gelb markiert und war ebenfalls bei keinem der analysierten Stämme von einer Mutation betroffen. Ebenfalls untersucht wurden 19 Sequenzen von sechs unterschiedlichen rearrangierten Isolaten, die im Vorfeld dieser Arbeit durch Klonierung aus dem Urin bzw. Plasma zweier Nierentransplantierten isoliert wurden. Von diesen 19 rearrangierten Isolaten konnte eine intakte Bindestelle W in 15 Isolaten detektiert werden, davon lag sie in zwei Isolaten zusammen mit der P-Q-Verbindung dupliziert vor. In drei Isolaten war die Bindestelle deletiert und in einer Sequenz konnte in der Bindestelle W eine Punktmutation nachgewiesen werden. Diese Sequenz wurde von PROMO trotzdem als potenzielle AP-1 Bindestelle erkannt (Sequenzen siehe Abschnitt 7.4 im Anhang). Darüber hinaus liegt auch im Gardner-Stamm, der in Abschnitt 3.2.3.1 der Einleitung näher beschrieben wurde, eine Duplikation der Bindestelle W vor (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass es sich bei der in dieser Arbeit erstmals nachgewiesenen AP-1 Bindestelle W in der NCCR archetypischer BKPyV um eine Bindestelle mit einer wichtigen Funktion im viralen Lebenszyklus handelt.

5.10.4 Bexaroten inhibiert die Bindung an die Bindestellen W und DII

Zur Untersuchung eines Effekts von Bexaroten und Fenretinid auf die Proteinbindung der Bindestellen W und DII wurden die Zellen 24 Stunden vor der Proteinextraktion zusätzlich zu PMA mit 20 μM Bexaroten oder 10 μM Fenretinid behandelt. Dadurch konnten auch Einflüsse der Retinoide auf zelluläre Signalwege, welche die Proteinbindung an die untersuchten Bindestellen regulieren, untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 33 gezeigt.

Durch die Behandlung der Zellen mit Bexaroten (Abbildung 33A und B) konnte sowohl bei der Bindestelle W, als auch der Bindestelle DII eine signifikante Inhibition der Proteinbindung durch Bexaroten nachgewiesen werden. In Zellen, die nicht mit PMA stimuliert wurden, führte die Behandlung mit Bexaroten zu einer um 48% verringerten Bindeaktivität ($p = 0,033$) an die Bindestelle W und zu einer um 27% verringerten Bindeaktivität ($p = 0,015$) an die Bindestelle DII. Die Bindung an die Bindestelle W wurde in PMA-stimulierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle um 49% gesenkt ($p = 0,017$), die Bindung an die Bindestelle DII um 46% ($p = 0,013$). Durch die Behandlung der Zellen mit Fenretinid (Abbildung 33C und D) konnte im Vergleich dazu eine nur geringe und nicht signifikante Reduktion der Bindeaktivität nachgewiesen werden. Die Behandlung mit Fenretinid von Zellen, die nicht mit PMA stimuliert wurden, führte zu einer um 11% verringerten ($p = 0,608$) Bindeaktivität der Bindestelle W und zu einer um 9% verringerten

Bindeaktivität der Bindestelle DII. In zusätzlich mit PMA stimulierten Zellen konnte durch die Behandlung mit Fenretinid keine verringerte Bindeaktivität der Bindestelle W ($p = 0,989$) und eine um 29% verringerte Bindeaktivität ($p = 0,073$) der Bindestelle DII nachgewiesen werden.

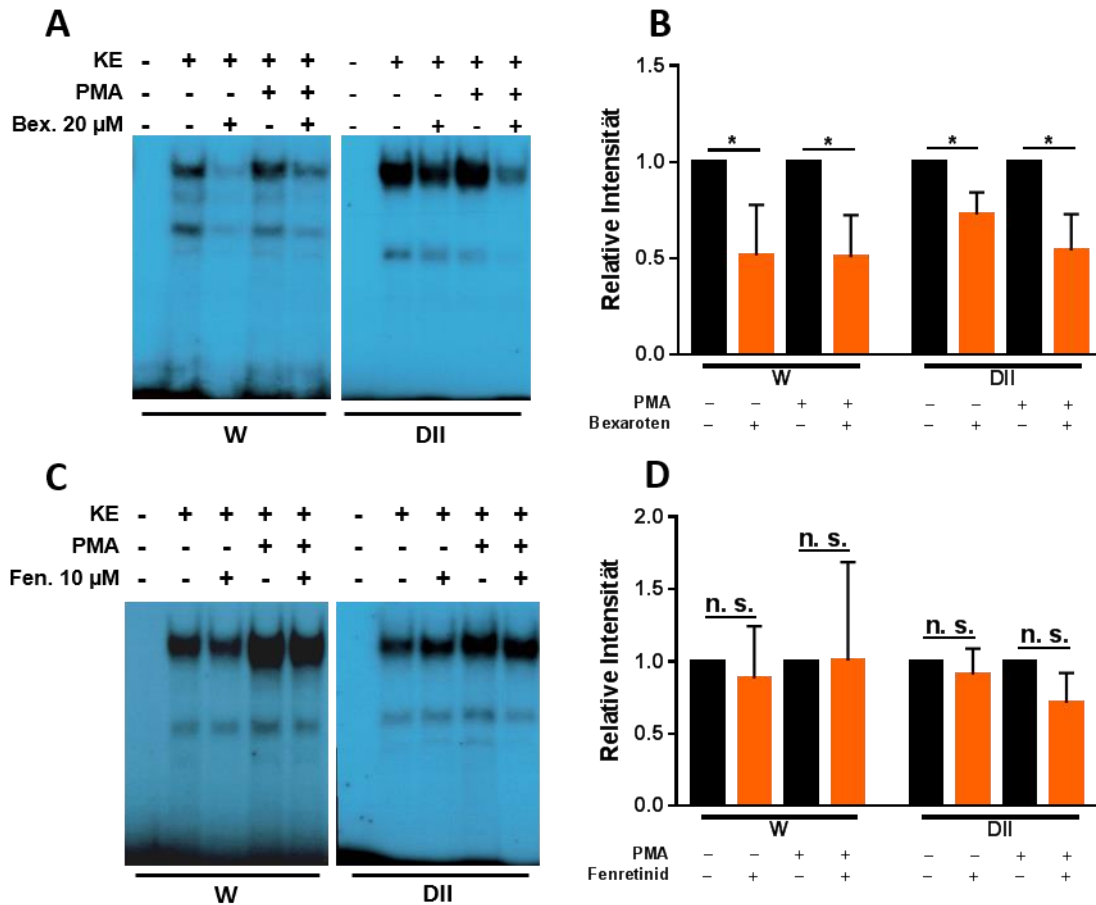


Abbildung 33: Indirekter Einfluss von Bexaroten und Fenretinid auf die PMA-induzierte Proteinbindung der Bindestellen W und DII.

RPTEC wurden für 24 Stunden mit PMA und 20 µM Bexaroten (**A**) oder 10 µM Fenretinid (**C**) stimuliert und die Induzierbarkeit der Proteinbindung durch PMA an die Bindestellen W und DII wurde mit Hilfe von EMSA untersucht. DMSO diente als Kontrolle. Die Intensitäten der detektierten Banden der Bexaroten (**B**) und Fenretinid (**D**) behandelten Zellen wurden densitometrisch quantifiziert. Zur Quantifizierung wurden die relativen gemessenen Intensitäten von drei unabhängigen Experimenten gemittelt und auf die unstimulierte Kontrolle normiert. Die Abbildungen 33A und C zeigen je ein repräsentatives Radiogramm dieser Versuche. n. s. = nicht signifikant, * $p < 0,05$.

5.10.5 Bexaroten inhibiert die Bindung an die Bindestellen W und DII direkt

Im nächsten Schritt sollte der direkte Einfluss der Retinoide Bexaroten und Fenretinid auf die PMA-Induktion von W und DII untersucht werden. Dazu wurde entweder Bexaroten in einer 20 µM Konzentration oder Fenretinid in einer 10 µM Konzentration bei der Durchführung des Experiments direkt zusammen mit den Kernextrakten in den Ansatz gegeben und anschließend mit dem Oligonukleotid der jeweiligen Bindestelle inkubiert (Abbildung 34). DMSO wurde als Kontrolle verwendet.

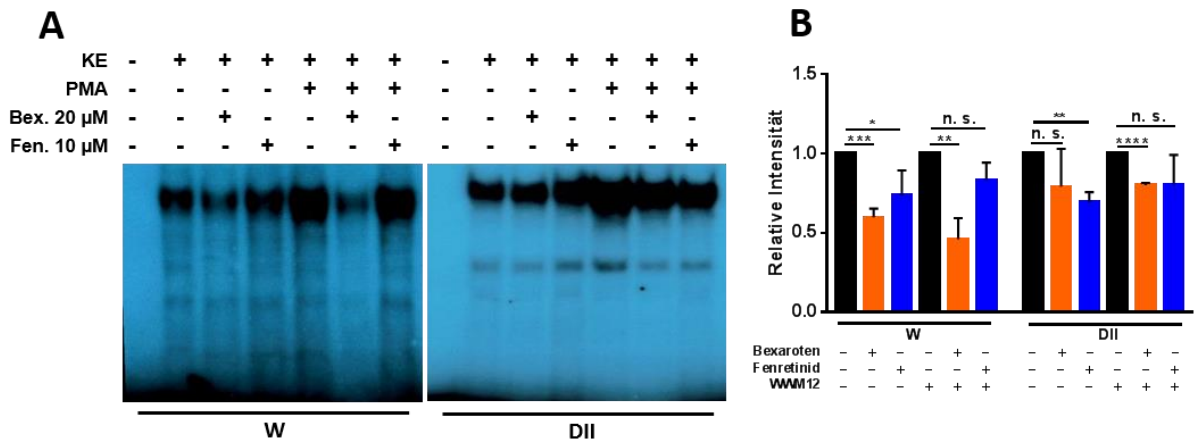


Abbildung 34: Direkter Einfluss von Bexaroten und Fenretinid auf die PMA-induzierte Proteinbindung der Bindestellen W und DII.

RPTEC wurden für 24 Stunden mit PMA stimuliert und die Induzierbarkeit der Proteinbindung durch PMA an die Bindestellen W und DII wurde mit Hilfe von EMSA untersucht (A). Bexaroten wurde in einer 20 μ M Konzentration und Fenretinid in einer 10 μ M Konzentration direkt zu den Kernextrakten zu dem Ansatz des Versuchs gegeben. DMSO diente als Kontrolle. Die Intensitäten der detektierten Banden wurden densitometrisch quantifiziert (B). Zur Quantifizierung wurden die relativen gemessenen Intensitäten von drei unabhängigen Experimenten gemittelt und auf die nicht-infizierte und unstimulierte Kontrolle normiert. Die Abbildung 34A zeigt ein repräsentatives Radiogramm dieser Versuche. n. s. = nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

In Zellen, die nicht mit PMA behandelt wurden, konnte die Proteinbindung an die Bindestelle W durch Bexaroten durchschnittlich um 40% ($p = 0,00023$) gesenkt werden. Durch Fenretinid durchschnittlich um 26% ($p = 0,044$). Nach Induktion der Bindung durch PMA konnte bei den mit Bexaroten inkubierten Proben eine um 54% reduzierte ($p = 0,0022$), bei den mit Fenretinid inkubierten Proben eine nicht signifikante um etwa 17% reduzierte Bindung ($p = 0,059$) detektiert werden. Die Effekte der Retinoide auf die Proteinbindung der Bindestelle DII waren im Vergleich dazu deutlich schwächer. Durch Bexaroten konnte in Zellen ohne PMA-Behandlung eine um 21% reduzierte ($p = 0,205$), durch Fenretinid eine um 31% reduzierte ($p = 0,0012$) Bindung nachgewiesen werden. In PMA stimulierten Zellen wurde die Bindung an DII durch Bexaroten signifikant um 20% ($p < 0,0001$), durch Fenretinid nicht signifikant um 20% inhibiert ($p = 0,144$).

5.10.7 Bexaroten inhibiert die WWM12-vermittelte Induktion der Bindeaktivität an W und DII

Zur Untersuchung des Effekts von Bexaroten und Fenretinid auf die Proteinbindung der Bindestellen W und DII in infizierten Zellen, wurden die Zellen mit WWM12 infiziert und direkt nach der Infektion mit 20 μ M Bexaroten oder 10 μ M Fenretinid behandelt. 48 Stunden nach der Infektion wurden Kernextrakte der Zellen präpariert und EMSA durchgeführt. Als Kontrolle wurden nicht-infizierte Zellen, sowie mit DMSO stiumlierte Zellen verwendet. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 35 dargestellt.

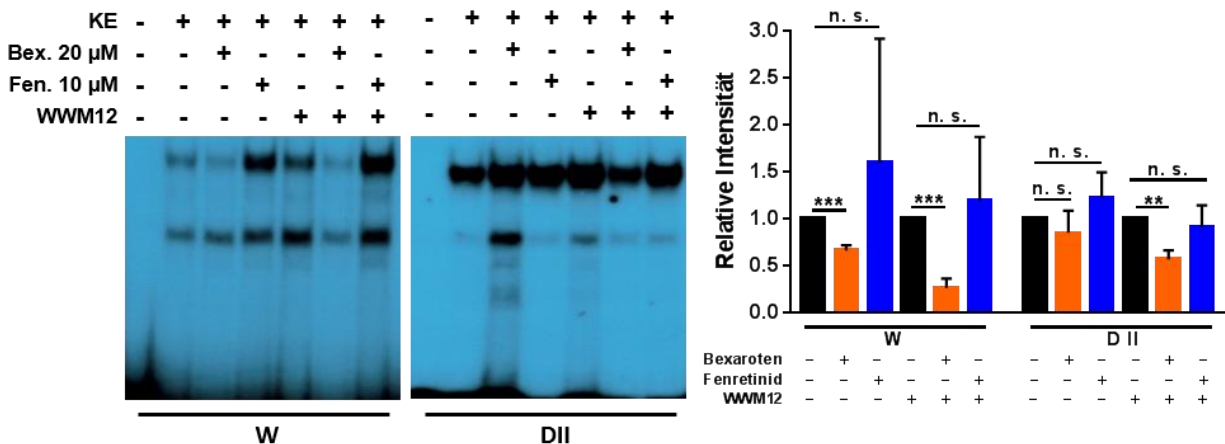


Abbildung 35: Indirekter Einfluss von Bexaroten und Fenretinid auf die Proteinbindung der Bindestellen W und DII in WWM12 infizierten Zellen.

RPTEC wurden mit dem WWM12-Stamm infiziert und mit 20 μ M Bexaroten oder 10 μ M Fenretinid direkt nach der Infektion behandelt. Nach 48 Stunden wurden Kernextrakte der Zellen präpariert und der Einfluss der Retinoide auf die Proteinbindung der Bindestellen W und DII wurde mit Hilfe von EMSA untersucht (A). Eine Behandlung mit DMSO bzw. uninfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Die Intensitäten der detektierten Banden wurden densitometrisch quantifiziert (B). Zur Quantifizierung wurden die relativen gemessenen Intensitäten von drei unabhängigen Experimenten gemittelt und auf die unstimulierte Kontrolle normiert. Abbildung 35A zeigt ein repräsentatives Radiogramm dieser Versuche. n. s. = nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Auffällig war bei diesen Experimenten, dass sowohl die Bindung an W, als auch an DII durch die virale Infektion der Zellenverstarkt wurde (Abbildung 35A). Durch die Behandlung mit Bexaroten konnte die Bindeaktivität W aber unabhängig der Induktion durch WWM12 signifikant inhibiert werden. In uninfizierten Zellen konnte die DNA-Bindung durch Bexaroten um 34% ($p = 0,0004$), in infizierten Zellen um 73% ($p = 0,00021$) reduziert werden (Abbildung 35B). Der Effekt von Bexaroten auf die Bindeaktivität von DII war im Vergleich dazu schwächer. In Extrakten uninfizierter Zellen wurde die Bindung durch die Behandlung mit Bexaroten um 15% ($p = 0,341$), in infizierten Zellen signifikant um 43% reduziert ($p = 0,0015$). Durch die Behandlung der Zellen konnte in diesen Experimenten keine Inhibition der Bindeaktivität beider untersuchter Bindestellen beobachtet werden. Die Proteinbindung von W wurde durch Fenretinid in nicht-infizierten Zellen um 60% ($p = 0,472$), in infizierten Zellen um 20% induziert ($p = 0,637$). Auch die Bindeaktivität von DII wurde in nicht-infizierten Zellen durch Fenretinid nicht signifikant induziert (um 23%; $p = 0,212$). In infizierten Zellen konnte durch Fenretinid-Behandlung durchschnittlich eine nicht signifikante um 9% ($p = 0,543$) reduzierte Proteinbindung nachgewiesen werden.

5.10.8 JunD und Fra-2 binden an die Bindestellen W und DII

In den bisher beschriebenen Experimenten konnte eine Induzierbarkeit der untersuchten potenziellen Bindestellen durch eine Stimulation der RPTEC mit PMA und durch die Infektion mit dem WWM12-Stamm nachgewiesen werden. Zur weiteren Charakterisierung der Bindeaktivität an den Bindestellen W und DII wurden *Supershift*-Analysen mit spezifischen, gegen die AP-1

Untereinheiten cJun, JunB, JunD, c-Fos, Fra-1 und Fra-2 gerichteten Antikörpern durchgeführt. Bei diesen Experimenten kann eine Bindung des Antikörpers an das DNA-bindende Protein zu einer weiteren Retardierung des Proteinkomplexes (*Supershift*) auf dem Radiogramm führen. Dieser Versuch wurde zweimal mit unterschiedlichen Kernextrakten von WWM12 infizierten und nicht-infizierten RPTEC durchgeführt. Geerntet wurden die Zellen 48 Stunden nach der Infektion. Die Ergebnisse eines dieser Experimente sind in Abbildung 36 dargestellt. Verwendet wurden Antikörper gegen die AP-1 Untereinheiten cJun, JunD, c-Fos, Fra-1 und Fra-2. Bei der Analyse der Bindestelle W wurde zusätzlich ein Antikörper gegen JunB verwendet. Ein Isotyp-Antikörper diente als Negativkontrolle. Die durch die Antikörper-Bindung verschobenen Banden wurden in der Abbildung mit einem Stern markiert.

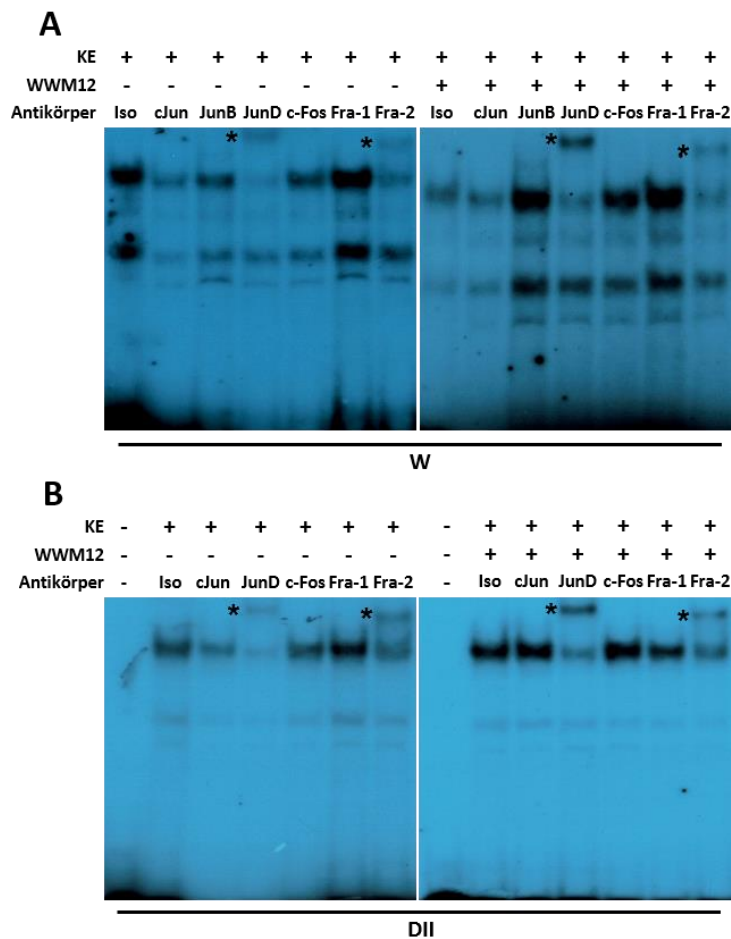


Abbildung 36: Supershift-Analysen von WWM12 infizierten Zellen mit Antikörpern gegen verschiedene Komponenten von AP-1.

RPTEC wurden mit dem WWM12-Stamm infiziert und nach 48 Stunden wurden Kernextrakte der Zellen präpariert. Durch Inkubation der Kernextrakte mit spezifischen gegen verschiedene AP-1 Komponenten gerichteten Antikörper, wurde die AP-1 Bindung an die Bindestellen W (**A**) und DII (**B**) untersucht. Als Kontrolle wurden uninfizierte Zellen verwendet. Dieser Versuch wurde zweimal mit Kernextrakten von unabhängigen Infektionen durchgeführt. Gezeigt ist je ein repräsentatives Radiogramm dieser Versuche. Die durch die Antikörperbindung verschobenen Banden sind mit einem Stern markiert. n. s. = nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Bei den Supershift-Analysen mit der Bindestelle W (Abbildung 36A) und Kernextrakten nicht-infizierter Zellen konnte eine verschobene Bande durch die Inkubation mit einem Antikörper gegen JunD und Fra-2 detektiert werden. Diese Verschiebung konnte auch in WWM12 infizierten Zellen nachgewiesen werden. Auch bei der Analyse der Bindeaktivität der Bindestelle DII (Abbildung 36B) konnte ein Shift der Banden durch den JunD- bzw. Fra-2-spezifischen Antikörper erreicht werden. Bei dieser Bindestelle konnte ebenfalls kein Einfluss der WWM12-Infektion auf die Selektivität der bindenden Untereinheiten beobachtet werden.

6 Diskussion

6.1 Die Replikation des BKPyV in primären RPTEC

Obwohl archetypische BKPyV-Stämme sowohl die übertragbaren, als auch die im Nierenepithel der proximalen Tubuli persistierenden Stämme darstellen, gibt es bis heute kein veröffentlichtes Replikationssystem für diese Stämme in ihren natürlichen Wirtszellen. Rearrangierte NCCR-Varianten treten nach Nierentransplantationen nur in 24% der Patienten mit Virämie auf. Sogar in PVAN-Patienten mit klinisch manifestierter BKPyV-Reaktivierung geht der Prozentsatz an Patienten mit auftretenden NCCR-Rearrangements nicht über die Hälfte der Betroffenen hinaus (Gosert et al., 2008). Da die etablierten Systeme desweiteren die Situation im Patienten direkt nach der Reaktivierung des BKPyV und vor der Entstehung von Rearrangements nicht abbilden können, ist ein System mit archetypischen Stämmen zur Erforschung des BKPyV-Lebenszyklus unbedingt erforderlich. Zwar eignen sich auch Replikationssysteme mit beispielsweise Urothelzellen oder rearrangierten BKPyV-Stämmen für Medikamententests, aber noch keines der in diesen Studien positiv getesteten Medikamente, wie z. B. Cidofovir, Leflunomid oder Sirolimus wurde in der Folge gegen BKPyV-assoziierte Erkrankungen in Nierentransplantierten zugelassen (Bernhoff et al., 2010; Tylden et al., 2015, Hirsch et al., 2016). Zusätzlich zu diesen Limitierungen ist zu beachten, dass durch eine große Heterogenität der NCCR-Struktur rearrangierter Stämme einzelne Laborstämme wie z. B. Dunlop, TU oder Gardner nur einen geringen Teil der Gesamtheit der im Patienten auftretenden Rearrangements repräsentieren. Da sich unterschiedliche archetypische Stämme in nur wenigen Punktmutationen in der NCCR voneinander unterscheiden, sind die Unterschiede ihres Lebenszyklus mutmaßlich geringer als bei rearrangierten Stämmen.

6.1.1 Archetypische BKPyV replizieren in primären RPTEC

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurde das System zur effizienten Replikation archetypischer BKPyV in primären RPTEC bereits teilweise etabliert. Dabei wurde der Einfluss verschiedener Parameter der Infektion auf die Replikationseffizienz untersucht (siehe Masterarbeit). Ein positiver Einfluss auf die Effizienz der Infektion und Replikation konnte bei diesen Experimenten unter anderem durch eine einstündige Zentrifugation der Virionen auf die Zellen, sowie durch die Verwendung von RPTEC in hohen Passagen nachgewiesen werden. Eine effizientere Infektion durch Zentrifugation wurde bislang überwiegend für verschiedene behüllte Virusfamilien, aber auch für unbehüllte Adenoviren beschrieben. Die Zentrifugation führt allgemein zu einer besseren Interaktion der Virionen mit der Wirtszellmembran (Ye et al., 2008; Ho et al., 1993). Die bessere Replikation des BKPyV in RPTEC höherer Passagen könnte auf eine beginnende Seneszenz der Zellen und dadurch bedingt einer höheren Expression von Faktoren der *DNA damage response*

zurückzuführen sein. Für die Proteinkinasen ATM und ATR wurde gezeigt, dass sie durch die BKPyV Infektion induziert werden und wiederum in der Lage sind die Replikation des BKPyV positiv zu beeinflussen. Daneben sind sie ebenfalls wichtig um DNA Schäden, die während der viralen Replikation im Wirtszellgenom auftreten, zu reparieren (Jiang et al., 2012).

Ein weiterer, nicht zu vernachlässigender Parameter der Infektionen dieser Arbeit ist die Dauer der Experimente. Bei den Versuchen mit REGM konnte eine Replikation des Dunlop erst nach mehr als drei, eine Replikation des WWM12 erst nach mehr als fünf Tagen nachgewiesen werden. In anderen Studien werden die Infektionen größtenteils nach drei oder vier Tagen beendet und die Zellen bzw. Überstände geerntet. Dafür werden teilweise deutlich höhere MOIs zur Dunlop-Infektion von teilweise 0,5 oder 1 IE/Zelle verwendet (Abend et al., 2007; Bernhoff et al., 2010). Durch die Optimierung der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Parameter und des Zellkulturmediums konnte die für eine effiziente Replikation beider Stämme notwendige MOI im Vergleich zu anderen Studien auf 0,02 IE/Zelle gesenkt werden, sofern die Infektion über einen Zeitraum von mindestens sieben Tagen durchgeführt wird.

6.1.2 Die Replikation archetypischer und rearrangierter BKPyV ist abhängig vom Zellkulturmedium

In der vorangegangenen Masterarbeit wurden ebenfalls Untersuchungen zur Abhängigkeit der Infektion und Replikation des BKPyV von der Zusammensetzung des Zellkulturmediums durchgeführt. Vor allem durch Choleratoxin konnte eine signifikant bessere Replikation des archetypischen BKPyV beobachtet werden. Ein negativer Einfluss konnte durch den Zusatz von EGF und Hydrocortison nachgewiesen werden. Bei der Zusammensetzung des in dieser Arbeit verwendeten BKIM wurden neben FKS und Choleratoxin noch Triiodthyronin, sowie Insulin als Zusätze verwendet. Die Abhängigkeit der viralen Replikation vom verwendeten Zellkulturmedium konnte durch den in Abbildung 11 gezeigten Vergleich bestätigt werden. Sowohl der archetypische Stamm WWM12, als auch der rearrangierte Stamm Dunlop replizierten signifikant besser in RPTEC, die in BKIM kultiviert wurden. Dem REGM wurden laut den Vorgaben des Herstellers vor der Verwendung EGF, Insulin, Hydrocortison, FKS, Transferrin, Triiodthyronin und Epinephrin zugesetzt. Insulin und Triiodthyronin werden ebenfalls im BKIM verwendet und können deshalb als verantwortliche Faktoren für die Unterschiede der viralen Replikation ausgeschlossen werden. Durch Transferrin konnte in Vorarbeiten dieser Arbeit keine veränderte Replikation des BKPyV beobachtet werden. Als ausschlaggebende Faktoren für die bessere Replikation beider Stämme in BKIM sind folglich Hydrocortison, EGF und Choleratoxin naheliegend.

Bei Hydrocortison handelt es sich um ein Glucocorticoid, welches als Ligand der Glucocorticoidrezeptoren fungiert und wegen wachstumsfördernden Effekten häufig in Kulturen epithelialer Zellen verwendet wird (Gaffney und Pigott, 1978; Zaidman et al., 2016). Von Glucocorticoidrezeptoren ist bekannt, dass sie Liganden-abhängig die transkriptionelle Aktivität von AP-1 inhibieren können, was den negativen Effekt von Hydrocortison auf die Replikation des BKPyV in den Vorarbeiten dieser Arbeit, sowie die schwache Replikation in REGM erklären könnte (Didonato et al., 1996). AP-1 wurde, wie bereits in Abschnitt 3.2.3.2 der Einleitung beschrieben wurde, als wichtiger Transkriptionsfaktor für die Genexpression des BKPyV identifiziert. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit mittels EMSA eine Induktion der AP-1 Aktivität durch das BKPyV beobachtet werden.

Choleratoxin wird hauptsächlich in Keratinozytenkulturen als Wachstumsfaktor verwendet. Seine wachstumsfördernden Eigenschaften sind auf die Erhöhung der intrazellulären Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in Folge einer Überaktivierung der Adenylatzyklase zurückzuführen (Okada et al., 1982). Dieser Mechanismus könnte auch für die verbesserte Replikation des BKPyV in Zellkulturmedium mit Choleratoxin als Zusatz verantwortlich sein. Bereits 1990 konnte durch Moens et al. gezeigt werden, dass die frühe Genexpression des BKPyV durch erhöhte Konzentrationen des cAMP-Analogons Dibutyryl-cAMP im Zellkulturmedium gesteigert werden konnte. Als Mechanismus wurde die Aktivierung eines CRE im P-Block, also dem frühen Promotor der NCCR des BKPyV durch den cAMP-Überschuss postuliert (Moens et al., 1990). Aber auch ein Effekt des Choleratoxins auf den Entry-Mechanismus des BKPyV ist denkbar. Das Choleratoxin wird ähnlich der Polyomaviren nach einer Bindung an die Ganglioside GM1 und GD1a in die Zelle aufgenommen, retrograd zum ER transportiert und dort ins Zytoplasma freigesetzt (Wolf et al., 1998; Spooner et al., 2006; Low et al., 2006). Auch wenn die Ergebnisse verschiedener Studien zeigen, dass sich die an diesen Mechanismen direkt beteiligten Proteine für das Choleratoxin und das BKPyV grundlegend unterscheiden, kann ein Zusammenhang beider Mechanismen nicht ausgeschlossen werden. Beide nutzen zum Verlassen des ER Komponenten des ERAD-Signalwegs (He et al., 2015). Das Choleratoxin könnte folglich Signalwege innerhalb des ER aktivieren, die das BKPyV für einen vereinfachten Transport durch die Wirtszelle mitbenutzen könnte. Ein interessanter Zusammenhang könnte in diesem System ebenfalls zwischen Choleratoxin und AP-1 bestehen. Mit Hilfe von EMSA konnte die Bindung des AP-1 Dimers JunD/Fra-2 an Bindestellen der NCCR des BKPyV nachgewiesen werden. In humanen Myelomzellen konnte gezeigt werden, dass cAMP die DNA-Bindeaktivität von JunD/Fra-2 stimuliert (Rezzonico et al., 1995). Vorausgesetzt, dass es sich bei AP-1 um einen positiven

Regulator der viralen Genexpression handelt, könnte Cholera toxin über diesen Mechanismus ebenfalls die virale Replikation fördern.

EGF ist bekannt als Wachstumsfaktor und Ligand der Familie der EGF-Rezeptoren (EGFR) (Harris et al., 2003). Bei den EGFR handelt es sich um Membran-gebundene Rezeptor-Thyrosinkinase, die nach Ligandenbindung internalisieren und eine Vielzahl von intrazellulären Signalwegen aktivieren, die das Zellwachstum stimulieren (Madhus und Stang, 2009). Durch den EGFR aktivierte Signalwege sind unter anderem der MAP-Kinase-Signalweg und der NF- κ B-Signalweg, die bereits als relevant für die BKPyV-Replikation beschrieben wurden (Normanno et al., 2006; Seamone et al., 2010; Gorrill und Khalili, 2005). Aufgrund dieser Funktionen wäre statt eines inhibitorischen Effekts von EGF auf die virale Replikation eher ein gegenteiliger Effekt zu erwarten gewesen. Eine mögliche Erklärung für die schwächere Replikation des BKPyV in REGM könnte die Blockierung der Aufnahme des BKPyV in die Wirtszelle durch EGF sein. Vom EGFR ist bekannt, dass er für diverse Viren als Rezeptor bzw. zur Initiierung der Aufnahme in die Wirtszelle genutzt werden kann (Zheng et al., 2014). Ein solcher Entry-Mechanismus ist unter anderem für die eng mit den Polyomaviren verwandten HPV beschrieben. Für HPV16 ist bekannt, dass eine Inhibition des EGFR die Aufnahme der Virionen in die Zelle hemmt. Eine durch die Bindung des HPV16 an EGFR ausgelöste Signalkaskade scheint dabei eine essenzielle Rolle zu spielen (Schelhaas et al., 2012). Vom EGFR ist ebenfalls bekannt, dass er mit Gangliosiden auf der extrazellulären Seite der Membran interagieren kann (Liu et al., 2004). Eine Rolle des EGFR beim Entry des BKPyV wurde bislang noch nicht untersucht, wäre aber denkbar. Die inhibitorische Wirkung von EGF auf die virale Replikation könnte dann zum einen durch eine Blockierung des EGFR/Gangliosidkomplexes bedingt sein, wodurch die Bindung des BKPyV an die Wirtszelle gestört sein könnte. Zum anderen könnte eine Vorstimulation der Zellen mit EGF aus dem Zellkulturmedium zu einer Internalisierung sämtlicher EGFR-Proteine auf der Zelloberfläche führen, sodass die Bindung des BKPyV und die Aufnahme in die Wirtszelle inhibiert wird.

6.1.3 Die NCCR archetypischer BKPyV in primären RPTEC ist stabil

Das Auftreten von Rearrangements nach der Passagierung archetypischer BKPyV wurde bereits früh in mehreren Studien beschrieben und bislang neben der geringen Effizienz als größte Limitierung der Replikation des Archetyps in primären Zellen angesehen (Howley et al., 1975; Rubinstein et al., 1991; Sundsfjord et al., 1990). Nur in der transformierten 293TT-Zelllinie konnte aufgrund der hohen TAg-Expression bislang eine stabile Replikation des Archetyps ohne auftretende Rearrangements etabliert werden (Broekema und Imperiale, 2012). In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine Replikation archetypischer BKPyV ohne das Auftreten von Rearrangements in der NCCR auch in primären RPTEC möglich ist. So wurde der

Archetyp in nur einer von 45 sequenzierten Proben unabhängiger Experimente als Hauptsspezies mutmaßlich durch rearrangierte Formen verdrängt. Zur Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Virusstocks wurden nur Überstände von infizierten 293TT-Zellen einer einzigen Infektion verwendet. Diese Virusstocks wurden zur Infektion der RPTEC verdünnt und diese Verdünnung nur jeweils einmal für RPTEC-Infektionen verwendet. Auf eine Passagierung der RPTEC-Überstände wurde verzichtet, um das Risiko auftretender Rearrangements der NCCR zu minimieren. Nur für den in Abbildung 14 gezeigten Test der Passagierbarkeit in RPTEC produzierter BKPyV wurde der Überstand wiederverwendet. Interessanterweise konnte bei diesem Experiment eine signifikant höhere Replikation des passagierten WWM12 detektiert werden. Da die NCCR-Sequenz der passagierten Viren nicht bestimmt wurde, könnte dieser Umstand auf das beginnende Hervortreten von Rearrangements der NCCR zurückzuführen sein.

6.1.4 Der Dunlop-Stamm repliziert effizienter als der WWM12-Stamm

Eine effizientere Replikation des Dunlop-Stamms in Zellkultursystemen wurde bereits mehrfach beschrieben (Hanssen Rinaldo et al., 2005; Li et al., 2013). Auch *in vivo* in Nierentransplantierten konnte gezeigt werden, dass auftretende Rearrangements mit einer höheren Urin- und Plasmaviruslast, sowie der Entstehung einer PVAN assoziiert sind (Gosert et al., 2008). Der naheliegende Grund für diese Unterschiede in der Replikationsrate ist die unterschiedliche NCCR-Struktur archetypischer und rearrangierter Stämme und dabei vor allem die Duplikation des P-Blocks in Stämmen wie z. B. dem Dunlop. Durch seine zentrale Lage in der archetypischen NCCR ist der P-Block sowohl Teil des Promotors der frühen, als auch der späten Genregion (Broekema und Imperiale, 2013). Viele bereits experimentell nachgewiesene, aber auch *in silico* vorhergesagte Bindestellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren liegen im P-Block und beeinflussen die virale Genexpression maßgeblich. Von Bethge et al. wurden 2015 Experimente zur Promotoraktivität verschiedener NCCR-Strukturen durchgeführt. Dabei wurde ein Reporterplasmid mit verschiedenen NCCR-Sequenzen hergestellt und die bidirektionale Genexpression gemessen. In dieser Veröffentlichung wurde postuliert, dass sich das Gleichgewicht der frühen und späten Genexpression je nach Verteilung der Bindestellen für Sp1, NF-1 und Ets1 in der Promotorregion der NCCR verschiebt. Dabei konnte für die NCCR des Dunlop eine sehr viel höhere Aktivität des frühen Promotors im Vergleich zur zum späten Promotor nachgewiesen werden (Bethge et al., 2015). Eine Abhängigkeit der Replikationseffizienz des BKPyV von der Aktivität des frühen Promotors der NCCR wurde zuvor bereits gezeigt (Broekema und Imperiale, 2013). In dieser Studie wurde angenommen, dass die Replikation des BKPyV bei einem Gleichgewicht auf der Seite der späten Genexpression durch die dadurch bedingte erhöhte

Expression der miRNA des BKPyV inhibiert wird. Diese miRNA kann wiederum die Expression des TAg und damit frühe Genexpression inhibieren, was zu einem negativen *Feedback loop* führt.

Interessanterweise konnte beim Nachweis der viralen Genexpression mittels Westernblot und Immunfluoreszenz in dieser Arbeit kein nennenswerter Unterschied zwischen der Expression des TAg der frühen Genregion und des VP1 der späten Genregion innerhalb der untersuchten Stämme detektiert werden. Sowohl die Expression des TAg, als auch die des VP1 war in Dunlop infizierten Zellen höher als in WWM12 infizierten Zellen. Darüber hinaus nahm die Expression beider Genregionen über die Zeit gleichermaßen zu. Dies steht im Widerspruch zu den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Hypothesen des Ungleichgewichts der Genexpression. Die in dieser Arbeit beobachtete gleichmäßige Zunahme sowohl der frühen, als auch der späten Genexpression erscheint nachvollziehbar, da anfänglich nur wenige Zellen infiziert sind und sich die Infektion über die Dauer des Experiments in der Zellkultur ausbreitet. Daraus folgt, dass der virale Lebenszyklus in verschiedenen Zellen in unterschiedlichen Phasen ist, weshalb, auf den gesamten Ansatz bezogen, sowohl eine frühe, als auch eine späte Genexpression gemessen werden kann.

Durch die Quantifizierung der infizierten Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion wird diese Behauptung gestützt. Die Quantifizierung der Infektiösität beider Stämme erfolgte an Tag 5 und die MOI wurde in diesen Versuchen angeglichen. Auch drei Tage nach der Infektion gab es keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an infizierten Zellen. Trotzdem scheint Dunlop aber wie erwartet schneller zu replizieren, da sieben bzw. 10 Tage nach der Infektion ein höherer Prozentsatz Dunlop infizierter Zellen gemessen werden konnte. Geringe Unterschiede bei der Aufnahme verschiedener BKPyV Stämme in die Wirtszelle sind aber nicht auszuschließen, da sich die in dieser Arbeit verwendeten Stämme in ihrem Serotyp voneinander unterscheiden. Der Dunlop-Stamm hat den Serotyp Ia, der WWM12 Stamm den Serotyp IVc2 (Daten nicht gezeigt). Von Pastrana et al. konnte mit verschiedenen Zelllinien gezeigt werden, dass sich Pseudovirionen mit unterschiedlichen Serotypen in ihrem Tropismus unterscheiden können (Pastrana et al., 2013).

Ebenfalls interessant könnten Unterschiede des Dunlop und WWM12 bei der Freisetzung von Nachkommen-Virionen aus der Zelle sein. Wie bereits in Abschnitt 3.2.6 beschrieben wurde, ist sowohl eine lytische, als auch eine nicht-lytische Freisetzung bereits beschrieben worden (Drachenberg et al., 2003; Evans et al., 2015). Von Drachenberg et al. wurde Patientenmaterial verwendet und eine Genotypisierung des BKPyV wurde nicht durchgeführt. Zum Nachweis der nicht-lytischen Freisetzung wurden von Evans et al. Dunlop-infizierte RPTEC verwendet. Mittels

Elektronenmikroskopie konnte für WWM12 in dieser Arbeit eine Vakuolisierung von Virionen im Zytoplasma nachgewiesen werden. Eine solche Vakuolisierung konnte von Evans et al. mittels Konfokalmikroskopie in Experimenten mit dem Anionenkanal-Inhibitor DIDS ebenfalls beobachtet werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine Akkumulation der Nachkommen-Virionen im Zytoplasma mit einer anschließenden nicht-lytischen Freisetzung assoziiert sein könnte. Aufnahmen von Dunlop-infizierten RPTEC wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. In Versuchen zur Replikation beider Stämme konnten in dieser Arbeit nach mehr als 10 Tagen deutliche zytopathische Effekte des Dunlop beobachtet werden. WWM12-infizierte RPTEC zeigten auch zu späteren Zeitpunkten keine auffälligen morphologischen Unterschiede zu nicht-infizierten Zellen (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen, sowie die Studien von Drachenberg et al. und Evans et al. lassen die Vermutung zu, dass beide Wege der Freisetzung in RPTEC möglich sind. Möglicherweise übersteigt die Produktion neuer Virionen Dunlop-infizierter Zellen aufgrund der hohen viralen Replikation ab einem gewissen Punkt die Kapazität der Zelle die Virionen vesikulär aus der Zelle zu transportieren. Dadurch könnte es zu einem wie von Drachenberg et al. beschriebenen „Anschwellen“ und ultimativ zu einer Lyse der Zelle kommen.

6.2 Therapieansätze zur Behandlung der BKPyV-Reaktivierung

6.2.1 Teriflunomid inhibiert die Replikation von WWM12 und Dunlop nur schwach

Der Effekt von Teriflunomid, dem aktiven Metaboliten des Medikaments Leflunomid auf die Replikation des BKPyV wurde bereits in anderen Zellkulturmodellen getestet. Verwendet wurden dabei bislang ausnahmslos rearrangierte Stämme (Gardner und Dunlop) (Bernhoff et al., 2010; Farasati et al., 2005; Jeffers-Francis et al., 2015). In nur einer Studie wurden primäre RPTEC verwendet. Die anderen verwendeten Zelltypen waren Speicheldrüsenzellen und fötale Lungenfibroblasten. In dieser Arbeit wurde der Effekt von Teriflunomid zum ersten Mal auf die Replikation archetypischer BKPyV getestet. Dabei konnte eine Inhibition der viralen Replikation von bis zu 44% erreicht werden. Die Replikation des Dunlop konnte um maximal 45% gesenkt werden. Verglichen mit den bereits veröffentlichten Studien waren die in dieser Arbeit verwendeten 10 und 20 μM Konzentrationen von Teriflunomid wesentlich niedriger als die in anderen Studien. Dadurch konnten zytostatische oder zytotoxische Effekte auf die Wirtszelle aber ausgeschlossen werden. Entsprechend waren die Effekte auf die virale Replikation in den anderen Studien stärker. In der Studie von Bernhoff et al. konnte durch eine Teriflunomid-Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$, was etwa 37 μM entspricht, eine Reduktion der Dunlop-Replikation um etwa eine Log-Stufe erreicht werden. Allerdings konnte bei dieser Konzentration mittels BrdU eine um etwa 50% verringerte Zellviabilität gemessen werden (Bernhoff et al., 2010). Auch in den

anderen beiden Studien konnte eine signifikante Inhibition der viralen Replikation durch Teriflunomid in diesem Konzentrationsbereich nachgewiesen werden, aber ebenfalls mit deutlichen negativen Effekten auf das Zellwachstum. Auch wenn die genannten Studien mit dieser Arbeit aufgrund der unterschiedlichen Länge der Experimente, den unterschiedlichen verwendeten MOIs der Infektion und den teilweise abweichenden Zelltypen schwer vergleichbar sind, scheint der inhibitorische Effekt von Teriflunomid mit einem signifikanten negativen Effekt auf das Zellwachstum assoziiert zu sein. Entsprechend wurde in den genannten Studien ebenfalls geschlussfolgert, dass Leflunomid aufgrund des geringen Selektivitätsindex (SI) für eine antivirale Therapie ungeeignet ist (Farasati et al., 2005). Auch in klinischen Untersuchungen konnte ein Nutzen von Leflunomid bei der Behandlung der BKPyV-Reaktivierung in Nierentransplantanten bislang nicht ausreichend belegt werden (Krisl et al., 2012; Bennett et al., 2012).

6.2.2 Das BKPyV aktiviert die Expression positiver Zellzyklusregulatoren

Um geeignetere Therapieansätze für die Behandlung von BKPyV-assoziierten Erkrankungen zu finden, wurde der Effekt der Replikation von Dunlop und WWM12 auf die Expression verschiedener positiver Zellzyklusregulatoren getestet. Da das BKPyV keine eigene DNA-Polymerase exprimiert und für die Initiierung der DNA-Replikation vollkommen abhängig von der Maschinerie der Wirtszelle ist, ist ein Eingriff des Virus in den Zellzyklus der Wirtszelle und ein Einfluss auf die Expression von Zellzyklusregulatoren naheliegend. Von Seamone et al. konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs über ERK1/2 die Replikation des BKPyV begünstigt (Seamone et al., 2010). Die aktive Beteiligung verschiedener Polyomaviren wie zum Beispiel dem SV40 an der Tumorentstehung setzt ebenfalls einen Eingriff in den Zellzyklus voraus. Für das TAg der Polyomaviren ist bekannt, dass es eine Bindedomäne für die Tumorsuppressoren p53 und pRb besitzt. Durch die direkte Bindung an diese Proteine und deren Inaktivierung kann der Übergang der Zelle in die S-Phase vermittelt werden (Topalis et al., 2013). Durch eine Genexpressionsanalyse mit dem TU-Stamm des BKPyV infizierter RPTEC konnte durch Abend et al. eine starke Induktion der Cyclin E2-Expression gezeigt werden. Ebenfalls stark hochreguliert war die mRNA-Expression der CDK1 (Abend et al., 2010). Bei einer vergleichbaren Studie mit Dunlop infizierten HUV-EC-C Zellen konnten ähnliche Effekte beobachtet werden. Zusätzlich konnte in dieser Studie eine Induktion der CDK2-Expression beobachtet werden (Grinde et al., 2007).

In dieser Arbeit konnte ebenfalls eine Induktion der mRNA-Expression der genannten Zellzyklusregulatoren nachgewiesen werden. Entsprechend der Studie von Abend et al. war die Induktion der CDK1 und Cyclin E2 Expression in dieser Arbeit sowohl durch Dunlop, als auch durch WWM12 deutlich stärker als die der CDK2 und des Cyclin E1. Erwartungsgemäßig war die

Induktion durch Dunlop im Vergleich zum WWM12 deutlich stärker, aber die Verhältnisse der Induktion der unterschiedlichen Faktoren waren bei beiden Stämmen fast identisch. Auf Proteinebene konnte überraschenderweise nur eine starke Induktion der CDK durch beide Stämme nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zur massiven Cyclin E2 Induktion und der nur schwachen Induktion der CDK2 auf mRNA-Ebene. Da in den Studien von Abend et al. (2010) und Grinde et al. (2007) nur die mRNA Expression gemessen wurde, ist kein Vergleich der Induktion der Proteinexpression in dieser Arbeit mit bereits veröffentlichten Daten möglich. Die Daten dieser Arbeit lassen jedoch auf eine wichtige Rolle Cyclin-abhängiger Kinasen im viralen Lebenszyklus schließen. Von der CDK2 ist bekannt, dass sie von Cyclin E aktiviert wird und durch die Phosphorylierung von pRb die Zellzyklusprogression unterstützt (Hinds et al., 1992; Grant und Cook 2017). In Experimenten mit Knockout-Mäusen konnte allerdings gezeigt werden, dass sowohl die CDK2, als auch Cyclin E für den Übertritt der Zelle in die S-Phase nicht essenziell zu sein scheinen (Aleem et al., 2004). Ebenfalls wurde gezeigt, dass CDK1 in diesen Mäusen bei einer Abwesenheit der CDK2 deren Verlust kompensieren kann (Aleem et al., 2005). Eine mögliche Interaktion von CDK1 mit Cyclin E wurde bereits früher beschrieben (Koff et al., 1991). Darüber hinaus sind für CDK1 vor allem Funktionen während des Übergangs der Zelle in die M-Phase bekannt (Kishimoto und Okumura, 1997).

6.2.3 Ro-3306 ist für eine antivirale Therapie nicht geeignet

Um den Einfluss der CDK1 auf die Replikation des BKPyV zu untersuchen wurde sie im nächsten Schritt mittels eines Inhibitors gehemmt. Der CDK1-Inhibitor Ro-3306 wurde 2006 zum ersten Mal als ATP-kompetitiver und reversibler CDK1-Inhibitor beschrieben (Vassilev et al., 2006). In dieser Arbeit konnte durch eine Stimulation der Zellen mit 5 μM oder 10 μM Ro-3306 Konzentration eine signifikante Inhibition der Replikation des Dunlop und des WWM12 erreicht werden. Geringere Konzentrationen führten zu keiner signifikanten Reduktion. Interessanterweise war der inhibitorische Effekt von Ro-3306 auf den Dunlop Stamm viel stärker als auf den WWM12 Stamm. Dieser Unterschied deutet auf eine größere Rolle der CDK1 bei der Replikation des Dunlop hin. Die stärkere Induktion der CDK1-Expression durch Dunlop stützt diese Hypothese. Auffällig war zudem, dass Konzentrationen $>5 \mu\text{M}$ zu einer signifikanten Zytotoxizität führten. Eine effiziente Inhibition der viralen Replikation bei geringen Effekten auf das Zellwachstum konnte nur bei der Dunlop-Infektion und nur durch eine 5 μM Konzentration erreicht werden. Das bedeutet, dass bei der Behandlung der Zellen mit Ro-3306 nur ein geringes Konzentrationsfenster für die gewünschten Effekte zur Verfügung steht. Dieses Ergebnis verdeutlicht zudem die Bedeutung eines archetypischen Replikationssystems für Medikamententests. Nur mit Hilfe eines solchen

Systems können auch Unterschiede der Medikamentenwirkung auf archetypische und rearrangierte Stämme, wie sie in diesem Experiment beobachtet wurden, untersucht werden.

Von Vassiliev et al. wurde Ro-3306 in Zellkultur in 9 μM Konzentration getestet, was zu einer Senkung der Zahl mitotischer Zellen führte. Im Vergleich zu den Versuchen mit RPTEC in dieser Arbeit konnte von Vassiliev et al. eine apoptotische Wirkung von Ro-3306 in nur etwa 10% nicht-transformierter Zellen nachgewiesen werden (Vassiliev et al., 2006). In dieser Arbeit wurde ein Rückgang der relativen Zellzahl um teilweise mehr als 50% gemessen, wobei durch den Neutralrottest nicht zwischen Nekrose und Apoptose unterschieden werden kann. Möglicherweise ist der Einfluss von Ro-3306 auf das Zellwachstum abhängig vom Zelltyp. Da für das BKPyV bislang kein Eingriff in die Regulation des Übergangs der Zelle in die M-Phase bekannt ist, suggeriert die inhibitorische Wirkung von Ro-3306 auf die virale Replikation eine Interaktion von CDK1 mit Regulatoren des S-Phase Checkpoints, wie es bereits in Abschnitt 6.2.2 beschrieben wurde. Abschließend ist aber festzuhalten, dass die Behandlung mit Ro-3306 aufgrund seiner schwächeren Wirkung auf archetypische BKPyV und den starken zytotoxischen Effekten in Konzentrationen $>5 \mu\text{M}$ kein geeigneter Therapieansatz für die Behandlung von BKPyV-assoziierten Erkrankungen zu sein scheint. Für eine effizientere Behandlung müssen Medikamente gefunden werden, die eine selektivere antivirale Wirkung mit weniger zytotoxischen Nebenwirkungen aufweisen.

6.3 Die Wirkung der Retinoide auf die BKPyV-Replikation

Wie bereits in Abschnitt 3.4.2 der Einleitung beschrieben wurde, ist eine der vielfältigen Funktionen der Retinoide und ihren Rezeptoren die Regulation der Proliferation und Differenzierung der Zelle. Vor allem die negative Regulation des Zellzyklus wurde häufig beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass die Retinoidrezeptoren in der Lage sind, die Expression von p21 und p27 positiv zu beeinflussen und dadurch die Aktivität der Cycline und Cyclin-abhängigen Kinasen zu senken, was den Übergang der Zelle in die S-Phase blockiert und in transformierten Zellen zur Apoptose führen kann (Liu et al., 1996; Li et al., 2004; Borriello et al., 2000). Diese Beobachtungen machen die Familie der Retinoide zu einer interessanten Substanzklasse für Tests gegen die Replikation des BKPyV. Im Gegensatz zu CDK-Inhibitoren wie zum Beispiel Ro-3306 haben Retinoide zwei Vorteile. Zum einen inhibieren sie die Zellzyklusprogression nicht durch eine direkte Interaktion mit positiven Zellzyklusregulatoren, sondern hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene durch Aktivierung der Expression negativer Zellzyklusregulatoren. Dadurch könnten zytotoxische Nebeneffekte unter Umständen minimiert werden. Zum andern sind mit Tretinoin, Acitretin und Bexaroten drei Retinoide bereits zur

systemischen Anwendung im Menschen zugelassen, wodurch ihre gute Toleranz bereits klinisch bewiesen wurde. Acitretin wurde darüber hinaus bereits bei Nierentransplantierten erfolgreich zur Chemoprävention und Behandlung maligner Hautveränderungen nach der Transplantation eingesetzt (Yuan et al. 1995; Carneiro et al., 2005; Hardin und Mydlarski, 2010).

Daneben sind bereits Wirkungen der Retinoide auf verschiedene Viren beschrieben. Es wurde gezeigt, dass ATRA die Replikation des Masernvirus durch eine Induktion des IFN-Signalwegs und der RIG-I-Expression inhibieren kann (Soye et al., 2011). Ein ähnlicher Mechanismus wurde für das Mumpsvirus nachgewiesen (Soye et al., 2013). Fenretinid wurde als Inhibitor der Replikation von Flaviviren beschrieben. Die Replikation sowohl des Denguevirus 2, als auch des Zikavirus konnte in einem Mausmodell bzw. in Zellkultur durch Fenretinid gehemmt werden (Carocci et al., 2015; Pitts et al., 2017). In diesen Studien konnte eine Reduktion der viralen RNA-Konzentration nach Fenretinid-Behandlung nachgewiesen werden. Eine inhibitorische Wirkung von Retinoiden auf DNA-Viren konnte ebenfalls bereits gezeigt werden. In HPV16-immortalisierten Fibroblasten führte eine Behandlung der Zellen mit ATRA zu einer Unterdrückung der Expression sowohl der Onkogene E6 und E7, als auch der von E2 und E5, auf transkriptioneller Ebene (Khan et al., 1993).

Bislang existieren noch keine Studien, die einen Zusammenhang zwischen Retinoiden und der Replikation des BKPyV beschreiben. Der Einfluss von ATRA auf die Infektion des SV40 wurde 1984 von Russell und Blalock untersucht. Aber aufgrund des stark abweichenden Versuchsaufbaus im Vergleich zu dieser Arbeit, können durch diese Studie keine Rückschlüsse auf die Ergebnisse dieser Arbeit gezogen werden. In dieser Studie wurden Zellen von Mausembryonen mit 1 μ M ATRA behandelt und die inhibitorische Wirkung von ATRA auf die SV40 Infektion mittels Hämagglutinationshemmtest gemessen (Russell und Blalock 1984). In einer anderen Studie wurde der Einfluss von ATRA auf die durch SV40 vermittelte Transformation von Rattenfibroblasten untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression von c-Fos durch die Behandlung der Zellen mit ATRA auf transkriptioneller Ebene supprimiert wurde. Ein direkter Einfluss auf die virale Replikation wurde nicht beschrieben (Talmage und Listerud 1994). In dieser Arbeit konnte mittels Transformationsassay in Softagar keine Transformation der primären RPTEC durch das BKPyV nachgewiesen werden.

6.3.1 Retinoide inhibieren die Replikation rearrangierter und archetypischer BKPyV

Die Behandlung der infizierten Zellen mit ATRA führte zu einer nur geringen Inhibition der viralen Replikation. Dieser schwache Effekt könnte zum einen an der geringen Rezeptorselektivität liegen. Zum anderen wurde beschrieben, dass ATRA abhängig von RAR β und unabhängig von

DNA-Schäden die Kinaseaktivität von ATM aktiviert (Fernandes et al., 2007). Wie bereits in Abschnitt 6.1.1 beschrieben wurde konnte ATM als positiver Regulator der Replikation des BKPyV identifiziert werden (Jiang et al., 2012). Dieser Mechanismus könnte einen möglicherweise inhibitorischen Effekt von ATRA auf die Replikation des BKPyV wieder aufheben.

Acitretin ist zugelassen zur systemischen Behandlung von Psoriasis. Der genaue Wirkmechanismus ist nicht bekannt, aber postuliert wird ein Zusammenspiel antiproliferativer und immunmodulatorischer Wirkmechanismen (Dogra und Yadav, 2014). Im Bezug auf den Einfluss von Acitretin auf das Zellwachstum gibt es unterschiedliche Beschreibungen. Zum einen scheint es in hyperproliferativem Gewebe eine Differenzierung auszulösen, in gesundem Gewebe wurde aber auch eine proliferative Wirkung von Acitretin beobachtet (Carretero et al., 2013; Harper, 1988). Im Bezug auf immunmodulatorische Funktionen konnte gezeigt werden, dass Acitretin die Infiltration von T_H1- und T_H2-Zellen in die Epidermis unterdrücken kann und die Produktion von IFN- γ und IL-17 dieser Zellen senkt (Niu et al., 2012). Desweiteren konnte in HaCaT-Zellen auch eine Inhibition der Expression von RANTES nach Acitretin-Behandlung beobachtet werden, die durch eine Inhibition der Translokation von NF- κ B und STAT1 in den Nukleus bedingt war (Zhang et al., 2008). Eine Inhibition der NF- κ B-Aktivität könnte möglicherweise auch für den inhibitorischen Effekt von Acitretin auf die Replikation des WWM12 verantwortlich sein. Die Unterschiede in der Wirkung von Acitretin auf Dunlop und WWM12 könnten auf die Replikationskapazitäten beider Stämme zurückzuführen sein. Die erhöhte Replikation und Genexpression des Dunlop könnte es diesem Stamm möglich machen, den inhibitorischen Effekten von Acitretin besser entgegenzuwirken.

Im Vergleich zu diesen beiden Retinoiden der ersten und zweiten Generation führte die Behandlung der infizierten Zellen mit Adapalen aus der dritten Generation zu einer signifikant um drei Log-Stufen reduzierten Replikation des WWM12 Stamms. In den effektiven Konzentrationen konnten allerdings zytostatische Nebenwirkungen gemessen. Auch für Adapalen wurde eine inhibitorische Wirkung auf den Zellzyklus bereits nachgewiesen. In Kolorektalkarzinom-Zelllinien konnte durch eine Behandlung der Zellen mit Adapalen ein Zellzyklusarrest in der G1-Phase beobachtet werden, der auf die Inhibition von CDK2 durch eine direkte Interaktion mit Adapalen zurückzuführen war (Shi et al., 2015). Eine Induktion der CDK2-Expression durch das BKPyV konnte in dieser Arbeit sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene gezeigt werden. Damit ist Adapalen ein interessantes Medikament zum Einsatz gegen das BKPyV. Bislang ist Adapalen allerdings nur als Gel oder Creme zur topischen Anwendung zugelassen und eine Zulassung zur systemischen Anwendung, die auch einen potenziellen Einsatz gegen das BKPyV ermöglichen würde, ist nicht in Aussicht.

Durch Bexaroten konnte die virale Replikation beider untersuchter Stämme um über 90% reduziert werden. In Konzentrationen $<40 \mu\text{M}$ konnte zudem kein negativer Effekt auf das Zellwachstum gemessen werden. Auch eine Gabe von Bexaroten drei Tage nach der Infektion führte noch zu einer hochsignifikanten Reduktion der Viruslast. Bexaroten ist hoch selektiv für RXR, weshalb es häufig als „Rexinoid“ bezeichnet wird (Boehm et al., 1994). In der Klinik ist es zur systemischen Behandlung kutaner T-Zell-Lymphome zugelassen, die genauen Wirkmechanismen dieser Wirkung sind aber noch nicht abschließend geklärt (Querfeld et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass Bexaroten die Aktivität von p53 und p73 erhöhen kann, was in Zellkulturen kutaner T-Zell-Lymphome zum Zellzyklusarrest führt (Nieto-Rementeria et al., 2009). Bezüglich der Zellzyklusregulation ist von Bexaroten desweiteren bekannt, dass es die Transkription von Cyclin D1 über den Suppressor DEC2 in Brustkrebszellen inhibieren kann und dass dieser Mechanismus ausschlaggebend für die inhibitorische Wirkung von Bexaroten auf das Wachstum diverser anderer Tumore ist (Li et al., 2011; Dragnev et al., 2007). Dagegen steht das Ergebnis dieser Arbeit, dass Bexaroten auch in weitaus höheren Konzentrationen als von Li et al. verwendet wurden, keine zytostatischen Effekte in den RPTEC auslöst. Die inhibitorische Wirkung auf das Tumorzellwachstum scheint also spezifisch für diese Tumorzellen zu sein. Ein weiterer bekannter Mechanismus, mit dem Bexaroten die Genexpression regulieren kann, ist die Interaktion mit den transkriptionellen Koaktivatoren p300 und CBP. In Schilddrüsenkarzinomen konnte eine Inhibition der transkriptionellen Aktivität von NF- κ B durch Freisetzung von CBP vom NF- κ B Zielpromotor nachgewiesen werden (Cras et al., 2012). Da NF- κ B auch an der Regulation der Replikation des BKPyV beteiligt ist, ist ein entsprechender Mechanismus auch in den RPTEC denkbar.

Fenretinid befindet sich zurzeit in klinischen Studien zur systemischen Behandlung verschiedener Krebsarten (Cooper et al., 2017). Eine Behandlung der infizierten RPTEC mit Fenretinid führte in einer $5 \mu\text{M}$ Konzentration in WWM12 infizierten Zellen zu einer Reduktion der Viruslast um etwa 90%, in Dunlop infizierten Zellen zu einer Reduktion von bis zu 73%, ohne messbaren Einfluss auf das Zellwachstum. Eine $10 \mu\text{M}$ Fenretinidkonzentration inhibierte die Replikation beider Stämme fast vollständig, hatte aber einen zytostatischen Nebeneffekt. Diese starke inhibitorische Wirkung auf die virale Replikation konnte auch bei einer Behandlung der Zellen mit Fenretinid fünf Tage nach der Infektion erreicht werden. Von Fenretinid ist bekannt, dass es in der Lage ist in verschiedenen Tumorzelltypen Apoptose auszulösen (Delia et al., 1993; Oridate et al., 1997; Supino et al., 1996). Dabei wurden sowohl Rezeptor-abhängige, als auch -unabhängige Wirkmechanismen nachgewiesen (Sheikh et al., 1995; Cazzaniga et al., 2012). Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass Fenretinid oxidativen Stress durch die Generierung reaktive

Sauerstoffspezies (ROS) in Tumorzellen unabhängig von Retinoidrezeptoren auszulösen kann (Sun et al., 1999). Diese proapoptotische Wirkung von Fenretinid könnte auch in dieser Arbeit mitverantwortlich für die nachgewiesenen negativen Effekte auf das Wachstum der RPTEC in Konzentrationen $>5 \mu\text{M}$, bzw. teilweise auch für die inhibitorische Wirkung auf die virale Replikation, sein. Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für die Inhibition der viralen Replikation durch Fenretinid könnte die Inhibition der Aufnahme des BKPyV in die Wirtszelle sein. Im Zusammenhang mit dem Denguevirus konnte eine Inhibition von Teilen der *Unfolded protein response* (UPR) durch Fenretinid gezeigt werden, wodurch der Transport des Denguevirus durch das ER inhibiert wurde (Fraser et al., 2016). Genaue Mechanismen des Transports des BKPyV durch das ER sind bislang noch nicht bekannt, aber ein retrograder Transport durch das ER wurde von Low et al. beschrieben (Low et al., 2006). Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der Inhibition der UPR durch Fenretinid und seiner Wirkung auf die virale Replikation. Ein solcher Zusammenhang würde die komplette Inhibition der Replikation aller untersuchten Stämme erklären, da durch diesen Mechanismus bereits die Aufnahme der Virionen in die Wirtszelle blockiert würde.

Aufgrund dieser vielfältigen und komplexen Funktionen der Retinoide und Retinoidrezeptoren gestaltet sich der experimentelle Nachweis der spezifischen Wirkmechanismen auf die Replikation des BKPyV allgemein schwierig. Unterschiedliche Mechanismen der einzelnen Retinoide sind vor allem auf die unterschiedliche Rezeptorselektivität zurückzuführen. Vor allem Bexaroten und Fenretinid weichen in ihrer zellulären Wirkung von der grundlegenden Wirkung von ATRA ab. Für alle Retinoide konnte allerdings eine Inhibition des Zellwachstums bzw. chemopräventive Eigenschaften bei der Tumorentstehung nachgewiesen werden. Da in dieser Arbeit die Induktion der CDK1- und CDK2-Expression durch das BKPyV in RPTEC gezeigt werden konnte, könnte ein Einfluss der Retinoide auf diese Proteine ein potenzieller Wirkmechanismus in diesem System sein.

6.3.2 Der Einfluss der Retinoide auf die Zellzyklusregulation

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von Bexaroten und Fenretinid auf die mRNA Expression von Cyclin E1 und E2, sowie CDK1 und CDK2 untersucht. Da neben infizierten Zellen auch nicht infizierte Zellen verwendet wurden, konnte auch der Effekt der Retinoide auf die Basalexpression dieser Gene in den RPTEC untersucht werden. Bei diesen Versuchen konnte kein signifikanter Effekt beider Retinoide auf die Expression von Cyclin E1 nachgewiesen werden. Auch der Einfluss auf die CDK2 Expression war nur sehr gering. Im Vergleich dazu konnte die Expression von Cyclin E2 durch Bexaroten und Fenretinid um mehr als die Hälfte reduziert werden. Auch die Expression

von CDK1 wurde durch beide Retinoide signifikant inhibiert, wobei der Effekt von Fenretinid deutlich stärker war.

Aufgrund der bereits in Abschnitt 6.3.1 beschriebenen inhibitorischen Wirkung der Retinoide auf den Zellzyklus ist die Suppression der Expression von CDK1 und Cyclin E2 durch Bexaroten und Fenretinid in diesen Experimenten nachvollziehbar. Interessanterweise konnte, trotz dieser Wirkung kein zytotoxischer Effekt beider Retinoide gemessen werden. Die Behandlung der Zellen mit Bexaroten führte zu einer über 90% reduzierten Viruslast ohne Effekt auf das Zellwachstum. Fenretinid inhibierte die virale Replikation fast komplett und es konnte im Vergleich zu Ro-3306 nur ein geringer Einfluss auf das Wachstum der RPTEC beobachtet werden. Dieser Gegensatz lässt sich nicht mit einem Zellzyklus-abhängigen inhibitorischen Effekt der Retinoide auf die BKPyV Replikation erklären. Diese Tatsache deutet auf einen zusätzlichen, möglicherweise direkten antiviralen Wirkmechanismus von Bexaroten und Fenretinid hin, der nicht direkt mit der Regulation des Zellwachstums assoziiert ist.

6.4 Bexaroten inhibiert die Bindung von AP-1 an Bindestellen der NCCR

6.4.1 AP-1 kann an die archetypische NCCR binden

Eine Bindung von AP-1 an die NCCR des BKPyV wurde zum ersten Mal 1988 beschrieben. In der Studie wurde mittels *DNase I Footprint Assay* eine Bindung von AP-1 an die NCCR des Dunlop postuliert, nicht jedoch an die archetypische NCCR (Markowitz und Dynan, 1988). Zur Aufreinigung des in diesen Experimenten verwendeten AP-1 wurde eine Präzipitation mit einer AP-1 Konsensussequenz durchgeführt. Dadurch kann eine Kontamination dieser Extrakte mit anderen Transkriptionsfaktoren nicht ausgeschlossen werden und die Ergebnisse dieser Studie sind kritisch zu hinterfragen. Auch in der parallel dazu veröffentlichten Studie von Deyerle und Subramani wurde eine Proteinbindung an diese Bindestelle beobachtet. Aber auch in dieser Studie konnte die Identität des bindenden Proteins nicht ausreichend belegt werden (Deyerle und Subramani, 1988). In beiden Studien, sowie von Cassill et al. wurde 1989 beschrieben, dass die nachgewiesenen AP-1 Bindestellen der Dunlop NCCR spezifisch für diesen Stamm sind, weil sie an der P/P-Verbindung aufgrund des Rearrangements entstanden sind. Zudem wurde eine wichtige Rolle dieser Bindestellen bei der Aktivierung der viralen Genexpression postuliert. Eine weitere Studie zu Transkriptionsfaktorbindestellen der NCCR wurde 2015 von Bethge et al. veröffentlicht. In dieser Studie wurde die Funktion von Sp1-Bindestellen in der NCCR untersucht. Mit Hilfe des auch in dieser Arbeit verwendeten Programms PROMO wurde in dieser Studie eine potenzielle Bindestelle für AP-1 an der Stelle der Bindestelle W in der archetypischen NCCR vorhergesagt. Die Sequenz der Bindestelle wurde in dieser Veröffentlichung jedoch nicht

angegeben und es erfolgte keine experimentelle Untersuchung dieser Bindestelle (Bethge et al., 2015). Erwähnt wurde diese Bindestelle als potenzielle AP-1 Bindestelle ebenfalls in den Studien von Cassill et al. (1989) und Moens et al. (1990), aber auch in diesen Studien wurde kein experimenteller Nachweis der Bindeaktivität dieser Bindestelle durchgeführt.

Mit Hilfe von PROMO konnten in dieser Arbeit experimentell noch nicht untersuchte AP-1 Bindestellen sowohl in der NCCR des Dunlop, als auch in der NCCR des Archetyps vorhergesagt werden. Zunächst wurde die Induzierbarkeit der Proteinbindung an allen untersuchten Bindestellen durch PMA untersucht. Von PMA ist bekannt, dass es durch die Aktivierung der Proteinkinase C unter anderem die Aktivität von AP-1 induzieren kann (Angel und Karin, 1991). Eine durch PMA induzierte Proteinbindung konnte an allen untersuchten Bindestellen nachgewiesen werden. Interessanterweise war die Bindung an die bereits beschriebene Bindestelle DI deutlich schwächer als an die zum ersten Mal untersuchten Bindestellen W und DII. Die Bindung an die im Dunlop und Archetyp vorhandene Bindestelle WD war ebenfalls nur sehr schwach. Aufgrund der nur schwachen Proteinbindung von DI und WD wurden weitere Untersuchungen nur noch mit den Bindestellen W und DII durchgeführt. Mit Hilfe von Supershift-Analysen mit spezifischen Antikörpern konnte die Bindung von AP-1 mit ihren Untereinheiten JunD und Fra-2 an W und DII eindeutig belegt werden. Diese Arbeit ist die erste, in der eine Bindung von AP-1 an eine Bindestelle der archetypischen NCCR nachgewiesen werden konnte.

Die Aussage von Markowitz und Dynan (1988), dass die durch ein Rearrangement entstandene Bindestelle DI an den P/P-Verbindungen im Dunlop ausschlaggebend für die Replikationseffizienz des Dunlop ist, kann mit den Ergebnissen dieser Arbeit nur teilweise bestätigt werden. Durch das Rearrangement existiert diese Bindestelle im Dunlop zwar dreifach, aber an der Stelle der P/Q-Verbindung konnte in der NCCR des Archetyps die Bindestelle W nachgewiesen werden. Diese Bindestelle zeigte in dieser Arbeit interessanterweise eine deutlich bessere Bindung im Vergleich zur in der Dunlop-NCCR neu an dieser Stelle entstandenen Bindestelle DI. Eine Untersuchung der NCCR anderer archetypischer und rearrangierter Stämme mit PROMO zeigte zudem, dass die Bindestelle W in fast allen in dieser Arbeit analysierten NCCR-Sequenzen konserviert ist, was auf eine Relevanz im viralen Lebenszyklus hindeutet. Eine Neuentstehung der bislang in anderen Studien als einzigstes nachgewiesenen AP-1 Bindestelle DI konnte bei den untersuchten rearrangierten NCCRs beider Patienten nicht nachgewiesen werden. Trotz der geringen Probenzahl lässt dieses Ergebnis die Vermutung zu, dass Dunlop für die Erforschung der Rolle von AP-1 im Lebenszyklus des BKPyV nicht repräsentativ ist.

In dieser Arbeit wurde daneben zum ersten Mal eine AP-1 Bindestelle an der P/S-Verbindung der Dunlop-NCCR nachgewiesen. Die Bindeaktivität dieser Bindestelle DII war die stärkste aller untersuchten Bindestellen. Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass diese Bindestelle bei der Dunlop-Replikation ebenfalls eine Rolle spielt. Trotz dieser Erkenntnisse ist die Funktion aller nachgewiesenen Bindestellen noch weitgehend unklar. Eine Möglichkeit zur Untersuchung ihrer Funktion bei der viralen Replikation wäre eine funktionelle Analyse mittels eines bidirektionalen Reporterplasmids, wie es unter anderem von Bethge et al. zur Charakterisierung von Sp1 Bindestellen verwendet wurde (Bethge et al., 2015).

Mit Hilfe dieser Versuche konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Bindeaktivität von AP-1 an die Bindestellen W und DII in WWM12 infizierten Zellen erhöht war. Vom BKPyV ist bekannt, dass es die Expression der JNK, sowie der p38 MAP-Kinasen induzieren kann (Hirsch et al., 2016). Umgekehrt konnte von Seamone et al. gezeigt werden, dass die Aktivierung des MAPK-Signalwegs zu einer erhöhten Replikation des BKPyV führt (Seamone et al., 2010). Auch die inhibitorische Wirkung des tAg auf die PP2A kann zu einer Aktivierung dieses Signalwegs führen (Yang et al., 1991). Die MAP-Kinasen können wiederum Untereinheiten von AP-1 phosphorylieren und dadurch aktivieren, was die erhöhte Bindeaktivität von AP-1 in infizierten Zellen erklären könnte (Karin 1995; Angel et al., 2001).

6.4.2 Bexaroten inhibiert die Bindung von AP-1 an die Bindestellen W und DII

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von Bexaroten und Fenretinid auf die Bindeaktivität von AP-1 an die Bindestellen W und DII untersucht. Eine Interaktion von Retinoidrezeptoren und der Aktivität von AP-1 wurde bereits mehrfach beschrieben. Zum einen scheint diese Funktion auf einer direkten Protein-Protein-Interaktion mit AP-1 zu beruhen (Schüle et al., 1991). Daneben wurde auch ein indirekter inhibitorischer Effekt beobachtet. Von Caelles et al. (1997) konnte gezeigt werden, dass aktivierte Retinoidrezeptoren den JNK-Signalweg und dadurch ebenfalls die AP-1 Aktivität inhibieren können. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass eine Behandlung von RPTEC mit Bexaroten die Bindung von AP-1 an die Bindestellen W und DII der NCCR direkt inhibiert. Eine direkte Interaktion von RXR mit AP-1, die zur Blockierung der DNA-Bindeaktivität von AP-1 führte, konnte bereits von Salbert et al. (1993) gezeigt werden. Ein weiterer Mechanismus, der im Vergleich dazu keine direkte Interaktion von RXR und AP-1 voraussetzt wurde ebenfalls beobachtet. Unabhängig von der DNA-Bindung von RXR konnte eine Repression der Cox-2 Expression nach Bexaroten-Behandlung durch Inhibition der Rekrutierung der Koaktivatoren p300 und CBP zum Promotor beobachtet werden (Kong et al., 2005). Aber auch gegensätzliche Mechanismen sind für Bexaroten und RXR bekannt. Bei der Expression von IGFBP-6 konnte eine kooperative Wirkung von RXR/RAR β Dimeren und AP-1 am Promotor

nachgewiesen werden (Uray et al., 2009). Eine direkte und RXR-unabhängige Interaktion von Bexaroten und AP-1, worauf die Ergebnisse dieser Arbeit schließen lassen, wurde bislang nicht beschrieben.

Da in dieser Arbeit nur eine Bindung der AP-1 Untereinheiten JunD und Fra-2 nachgewiesen wurde und in den oben beschriebenen Studien ausschließlich c-Jun und c-Fos untersucht wurden, sind diese Studien mit dieser Arbeit nur bedingt vergleichbar. Die Interaktion von Retinoiden mit JunD/Fra-2 wurde bislang nur in einer Studie beschrieben. Dort konnte in HeLa-Zellen gezeigt werden, dass sich die Zusammensetzung des AP-1 Komplexes nach der Behandlung der Zellen mit ATRA ändert und das JunD/Fra-2 Dimer durch JunD/FosB ersetzt wird. In diesem Zusammenhang konnte auch eine direkte Interaktion von RAR α und JunD beobachtet werden (Benkoussa et al., 2002). Nimmt man für Bexaroten eine ähnliche Wirkung an, könnte eine Änderung der Zusammensetzung von AP-1 nach der Behandlung mit Bexaroten in dieser Arbeit ebenfalls zu einer Änderung der Bindungsaffinität zu beiden untersuchten Bindestellen führen.

Interessant ist zudem, dass Fra-2 in kutanen T-Zelllymphomen im Vergleich zu gesunden CD4⁺ T-Zellen konstitutiv exprimiert wird und im Heterodimer mit JunD unter anderem die Expression von MYB und MDM2 verstärken kann (Nakayama et al., 2012). Bei beiden Proteinen handelt es sich um Proto-Onkogene und MDM2 ist als E3 Ubiquitinligase ein bekannter negativer Regulator von p53 (Nakayama et al., 2012; Vargas et al., 2003). Wie bereits in den Abschnitten 3.4.3 und 6.3.1 beschrieben wurde, ist Bexaroten zurzeit nur gegen kutane T-Zelllymphome als Medikament zugelassen und der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht bekannt. Somit könnte ein Zusammenhang zwischen der Wirkung von Bexaroten in kutanen T-Zelllymphomen und der in dieser Arbeit beobachteten Inhibition der JunD/Fra-2 Bindung an die NCCR des BKPyV bestehen. Beide Effekte von Bexaroten könnten durch den gleichen Mechanismus hervorgerufen werden. Die Expression von MDM2 wurde in RPTEC noch nicht untersucht, aber eine Inhibition von MDM2 in RPTEC und eine dadurch erhöhte Expression von p53 könnte ebenfalls ein möglicher Grund für die Inhibition der viralen Replikation nach der Behandlung mit Bexaroten sein.

Im Vergleich zu Bexaroten konnte durch Fenretinid keine signifikante Inhibition der Bindung von AP-1 an die Bindestellen W und DII nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien. In Brustkrebszelllinien konnte im Vergleich zu ATRA keine negative Wirkung von Fenretinid auf AP-1 nachgewiesen werden (Sheikh et al., 1995). Von Appierto et al. konnte sogar ein gegenteiliger Effekt beobachtet werden. In dieser Studie wurde die Expression von c-Fos und c-Jun durch Fenretinid induziert und damit die positive Wirkung von PMA auf die

AP-1 Aktivität potenziert. Dieser Effekt wurde aber als stark abhängig vom verwendeten Zelltyp und dem Expressionsmuster der AP-1 Untereinheiten beschrieben (Appierto et al., 2004).

Ein interessanter Faktor bei der Interaktion von RAR/RXR und AP-1 könnte auch die räumliche Nähe von RAR/RXR- und AP-1 Bindestellen in der NCCR sein. Bei der von Uray et al. beschriebenen Kooperation von RXR/RAR β mit AP-1 zur Aktivierung der IGF1BP3 Expression lagen die Bindestellen für RAR/RXR und AP-1 in der verantwortlichen Enhancer-Region in direkter räumlicher Nähe (Uray et al., 2009). Diese Nähe beider Bindestellen begünstigte die Interaktion beider Komplexe miteinander. Auch die untersuchten Bindestellen W und DII in der NCCR des BKPyV liegen in direkter Nähe zu einer vorhergesagten Bindestelle für RAR/RXR (Analyse mit PROMO, siehe Abbildung 3). Interessanterweise ist diese vorhergesagte Bindestelle deckungsgleich mit der in dieser Arbeit ebenfalls untersuchten AP-1 Bindestelle WD. An dieser Bindestelle könnte es also möglicherweise zu einer Konkurrenz zwischen RAR/RXR und AP-1 kommen. Bezogen auf die AP-1 Bindung an die Bindestellen W und DII könnte eine Interaktion mit RAR/RXR ebenfalls ein ausschlaggebender Faktor für die virale Genexpression sein. Abhängig von der Zusammensetzung des RAR/RXR- und des AP-1 Komplexes könnte es also wie von Uray et al. beschrieben zu einer Kooperation zwischen beiden Transkriptionsfaktoren kommen oder auch zu einer Verdrängung bzw. Inhibition (Uray et al., 2009). Auch eine Konkurrenz um die Bindung von p300 und CBP, wie es von Kong et al. (2005) beschrieben wurde, wäre an diesen Bindestellen denkbar. Eine solche Interaktion beider Faktoren könnte ebenfalls für die inhibitorische Wirkung von Bexaroten auf die JunD/Fra-2 Bindung an diese Bindestellen verantwortlich sein. Die in Abbildung 3 gezeigte potenzielle RAR/RXR-Bindestelle wurde von Moens et al. (1990) ebenfalls als CRE beschrieben. Somit ist auch ein Einfluss des Choleratoxin im Zellkulturmedium und eine Konkurrenz mit CREB an dieser Stelle möglich. Die Bindung von RAR/RXR bzw. CREB an diese Bindestelle und das Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, ist aber ein interessanter Anknüpfungspunkt für zukünftige Arbeiten.

Die Ergebnisse dieser Experimente deuten darauf hin, dass der inhibitorische Effekt von Fenretinid auf die Replikation des BKPyV unabhängig von AP-1 ist. Im Vergleich dazu konnte ein direkter Effekt von Bexaroten auf die DNA-Bindung von AP-1 (JunD/Fra-2) als Wirkmechanismus identifiziert werden. Diese Beobachtung passt auch zur unterschiedlichen Wirkung beider Retinoide auf das Zellwachstum der RPTEC. Bexaroten scheint seine inhibitorische Wirkung auf die Replikation des BKPyV durch einen antiviralen Effekt auszuüben, der unabhängig von der Zellzyklusregulation ist. Deshalb sind seine Nebenwirkungen auf das Zellwachstum entsprechend gering. Für Fenretinid konnte mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten kein direkt

antiviraler Mechanismus identifiziert werden. Es scheint seine inhibitorische Wirkung auf die Replikation des BKPyV scheinbar überwiegend über die Zellzyklusregulation ausüben, worauf die zytotoxischen Nebenwirkungen in höheren Dosen zurückzuführen sein könnten. Daneben sind für beide Medikamente ebenfalls zurzeit noch unbekannte Mechanismen denkbar.

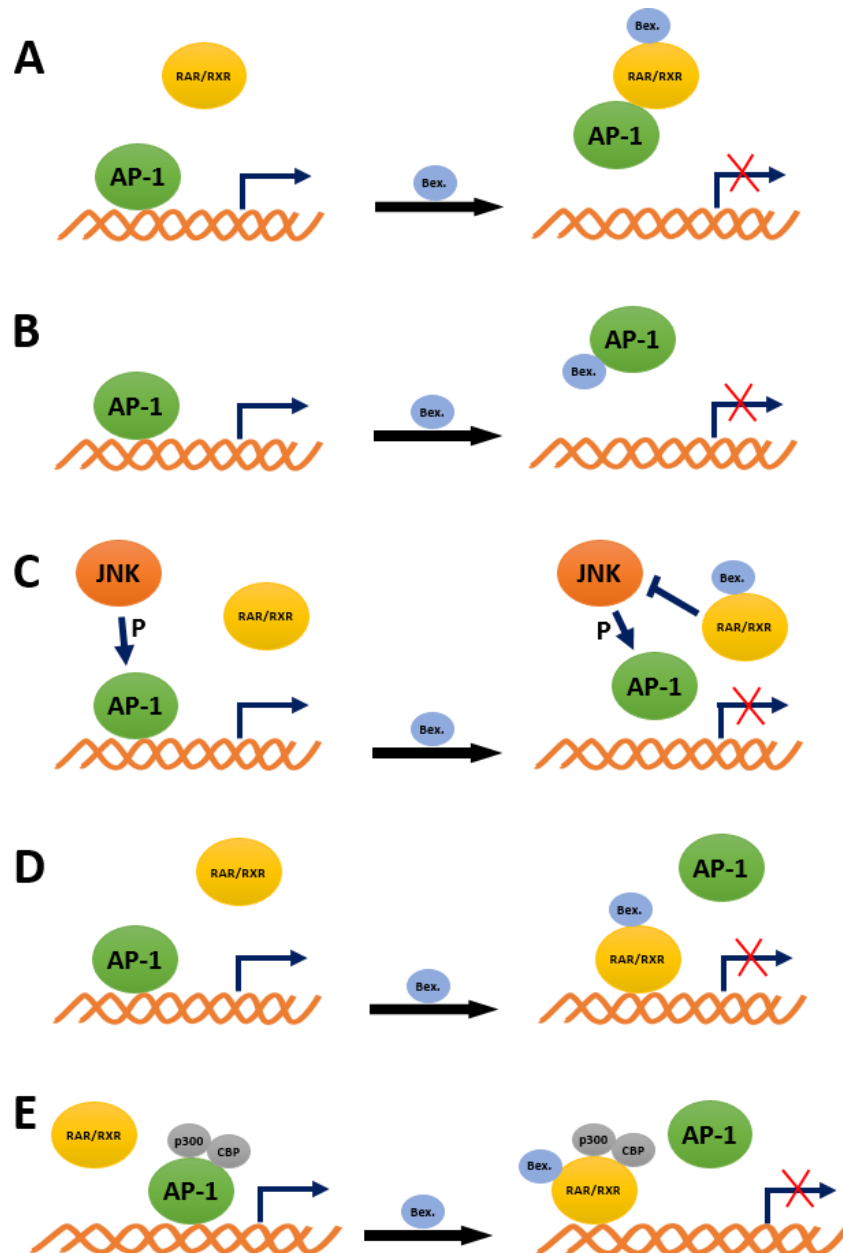


Abbildung 37: Hypothesen zum Mechanismus der inhibitorischen Wirkung von Bexaroten auf die Bindeaktivität von AP-1 an der NCCR.

(A) Indirekter Effekt durch Interaktion von aktiviertem RAR/RXR mit dem AP-1 Komplex. **(B)** Direkte Inhibition durch direkte Bindung von Bexaroten an AP-1. **(C)** Indirekter Effekt durch Inhibition der JNK-vermittelten Aktivierung von AP-1 durch aktivierte RAR/RXR. **(D)** Indirekter Effekt durch Verdrängung von AP-1 durch aktivierte RAR/RXR. **(E)** Indirekter Effekt durch Konkurrenz von AP-1 und aktiviertem RAR/RXR um die Bindung der Koaktivatoren p300 und CBP.

Abbildung 37 zeigt eine zusammenfassende Übersicht über mögliche Mechanismen der Inhibition der AP-1 Bindung an die NCCR durch Bexaroten, die sich aus der Diskussion im Abschnitt 6.4.2 ergeben. Wie im Text bereits beschrieben wurde, könnte die Inhibition durch einen indirekten Effekt einer Protein-Protein-Interaktion von RAR/RXR und AP-1 (Abbildung 37A) oder eine direkte Bindung von Bexaroten an AP-1 (Abbildung 37B) bedingt sein. Desweiteren könnte auch eine Inhibition der JNK-vermittelten Phosphorylierung von AP-1 Untereinheiten durch aktivierte RAR/RXR (Abbildung 37C) dafür verantwortlich sein. Da es in direkter Nachbarschaft zur AP-1 Bindestelle W auch eine potenzielle RAR/RXR-Bindestelle gibt, wäre auch eine Verdrängung von AP-1 von der NCCR durch RAR/RXR nach Bexaroten-Behandlung denkbar (Abbildung 37D). Ebenfalls könnte es zu einer Konkurrenz beider Transkriptionsfaktoren um die Rekrutierung der für die Transkription wichtigen Koaktivatoren p300 und CBP kommen (Abbildung 37E).

6.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Mit Hilfe dieses bislang einzigartigen Replikationssystems für archetypische BKPyV in RPTEC konnte in dieser Arbeit erstmals die Replikation rearrangierter BKPyV mit archetypischen BKPyV in den natürlichen Wirtszellen des Virus verglichen werden. Mit Hilfe dieses Systems ist es zum einen möglich die Reaktivierung des BKPyV in Patienten vor der potenziellen Entstehung von Rearrangements der NCCR zu untersuchen, zum andern können durch den Vergleich archetypischer Stämme mit rearrangierten Stämmen Unterschiede im viralen Lebenszyklus beispielsweise durch eine vergleichende Genexpressionsanalyse infizierter Zellen herausgearbeitet werden. Ebenso ermöglicht dieses System Tests von Medikamenten gegen die Replikation des BKPyV und die Etablierung neuer Therapieansätze. Die unterschiedlich starke Wirkung von Ro-3306 und Acitretin auf die Replikation des archetypischen WWM12- und des rearrangierten Dunlop-Stamms verdeutlicht die Relevanz eines solchen vergleichenden Replikationssystems.

Durch diese *in vitro* Medikamententests konnten Retinoide als vielversprechende Medikamente für eine Therapie BKPyV-assoziiierter Erkrankungen identifiziert werden. Vor allem durch Bexaroten und Fenretinid konnten starke inhibitorische Effekte auf die Replikation archetypischer und rearrangierter BKPyV, bei geringen Nebenwirkungen, erzielt werden. Bexaroten ist zur klinischen Behandlung kutaner T-Zelllymphome bereits zugelassen, Fenretinid befindet sich zurzeit in klinischen Studien. Erste Studien konnten eine gute Verträglichkeit in der Klinik bereits bestätigen, aber die Zulassung steht bislang noch aus (Camerini et al., 2001; Vaishampayan et al., 2005). Neu etablierte Fenretinid-Präparate zeigten in Tests verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften im Vergleich zu früheren Studien (Cooper et al., 2017). Ein nächster Schritt wäre der klinische Einsatz dieser Medikamente zur Untersuchung ihrer Wirksamkeit bei BKPyV-assoziierten Erkrankungen. Durch die in dieser Arbeit gezeigte direkte inhibitorische Wirkung von Bexaroten auf die AP-1 Bindung an Bindestellen der NCCR des BKPyV könnte für die Zukunft ebenfalls die Entwicklung spezifischer AP-1 Inhibitoren interessant sein. Ein weiterer interessanter Ansatzpunkt für zukünftige Arbeiten ist in diesem Zusammenhang eine genauere Untersuchung der Interaktion von Retinoiden und ihren Rezeptoren mit AP-1 an der NCCR des BKPyV, wie es in Abbildung 37 hypothetisch dargestellt ist.

7 Anhang

7.1 NCCR-Sequenz der Hauptspezies des BKPyV-Isolats M401

TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAAAAGCC
 TCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGGGGGGCCTGGCCTCTTATATTTTAT
 AAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCTATGGAATGTAGCCAAACCATGACCTCAGGAA
 GGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGAAACCCCGCCCCCGAAATTC
 CAAATAAACACAAGAGGAAGGGGAAACGGCCAAAGGAGTGGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTT
 TGCAGCCTAGAAATCTTGGCCTTGTCCCCAGTTAACTGGAAAAAGGCC

Die Basenaustausche im Vergleich zum Stamm WWM12 wurden rot markiert.

7.2 Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Virusstocks

Zur WWM12 Anzucht wurden zwei Infektionen der 293TT Zellen durchgeführt (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Übersicht über die Überstände der 293TT-Infektionen zur Anzucht des WWM12 Stamms.

Infektion	Viruslast Ausgangsurin [Gäq/ml]	Überstand	Viruslast Überstand [Gäq/ml]	Virusstock	Viruslast Stock [Gäq/ml]
1	2,3 x 10 ¹⁰	Woche 5	5,21 x 10 ⁹	Stock 1	4,19 x 10⁹
		Woche 6	4,63 x 10 ⁹		
2	2,3 x 10 ¹⁰	Woche 2	7,87 x 10 ⁸	Stock 2	2,25 x 10⁹
		Woche 3	3,44 x 10 ⁹		
		Woche 4	4,36 x 10 ⁹		
		Woche 8	2,14 x 10 ⁹	Stock 3	1,41 x 10⁹
		Woche 9	3,00 x 10 ⁹		
		Woche 9	2,11 x 10 ⁹		
		Woche 10	1,09 x 10 ⁹		
Woche 10	6,43 x 10 ⁸				

Nach der ersten Infektion wurde der Virusstock 1 mit 4,19 x 10⁹ Gäq/ml aus Überständen von Woche 5 und Woche 6 hergestellt. Aus der zweiten Infektion wurden zwei Stocks erstellt. Der Stock 2 wurde aus Überständen der Woche 2, 3 und 4 nach der Infektion gemischt und enthielt eine Viruslast von 2,25 x 10⁹ Gäq/ml. Stock 3 wurde hergestellt aus Überständen aus den Wochen 8, 9 und 10 nach der Infektion. Aufgrund der hohen viralen Replikation wurden in den Wochen 9 und 10 je zweimal Überstände abgenommen. Als Viruslast von Stock 3 wurden 1,41 x 10⁹ Gäq/ml

gemessen. Zur besseren Vergleichbarkeit der Experimente wurde für alle WWM12-Infektionen dieser Arbeit der Stock 1 verwendet.

Zur Anzucht des WWT-Stammes wurde eine Infektion der 293TT-Zellen mit Patientenurin mit einer Viruslast von $1,6 \times 10^9$ Gäq/ml durchgeführt (Tabelle 16). Die Überstände aus Woche 6 und Woche 7 nach der Infektion wurden jeweils als Stock weggefroren und Stock 2 mit einer Viruslast von $6,27 \times 10^9$ Gäq/ml wurde für alle Experimente dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 16: Übersicht über die Überstände der 293TT-Infektion zur Anzucht des WWT Stammes.

Viruslast Ausgangsurin	Überstand	Viruslast Überstand	Virusstock
$1,6 \times 10^9$	Woche 6	$1,95 \times 10^9$	Stock 1
	Woche 7	$6,27 \times 10^9$	Stock 2

Zur Infektion der 293TT Zellen mit dem M401-Isolat wurde eine Urinprobe mit einer Viruslast von $1,1 \times 10^{10}$ Gäq/ml verwendet (Tabelle 17). Die Überstände von Woche 3, 4, 5 und 6 nach der Infektion erhielten Viruslasten $>5 \times 10^8$ Gäq und wurden als Stock weggefroren. Für alle nachfolgenden Experimente wurde Stock 3 mit einer Viruslast von $1,16 \times 10^{10}$ Gäq/ml verwendet.

Tabelle 17: Übersicht über die Überstände der 293TT-Infektion zur Anzucht des M401 Stammes.

Viruslast Ausgangsurin	Überstand	Viruslast Überstand	Virusstock
$1,1 \times 10^{10}$	Woche 3	$9,72 \times 10^8$	Stock 1
	Woche 4	$3,34 \times 10^9$	Stock 2
	Woche 5	$1,16 \times 10^{10}$	Stock 3
	Woche 6	$1,5 \times 10^{10}$	Stock 4

Zur Anzucht des Dunlop-Stammes wurden die in 6-Well Platten mit dem Dunlop-Genom transfizierten Zellen 5 Tage nach der Transfektion in je eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt und zwei Flaschen wurden für die Herstellung des Virusstocks verwendet (Tabelle 18). Die verwendeten Überstände wurden den Zellen in Woche 2, 3, 4 und 5 nach der Überführung in die Flaschen abgenommen. In Woche 3 wurden sowohl am Anfang, als auch am Ende der Woche Überstände gesammelt. Aufgrund einer zu geringen Viruslast des Überstandes einer Flasche in Woche 5 wurde dieser verworfen. Aus allen anderen gesammelten Überständen wurde ein Stock mit einer Viruslast von $1,2 \times 10^{10}$ Gäq/ml generiert.

Tabelle 18: Übersicht über die Überstände der 293TT-Zellen zur Anzucht des Dunlop-Stamms.

Überstand	Viruslast	Viruslast Stock
Woche 2	3,59 x 10 ⁹ 1,07 x 10 ⁹	
Woche 3	1,13 x 10 ¹⁰ 9,37 x 10 ⁹	
Woche 3	1,92 x 10 ¹⁰ 1,55 x 10 ¹⁰	1,2 x 10 ¹⁰
Woche 4	2,68 x 10 ⁹ 2,69 x 10 ⁹	
Woche 5	2,06 x 10 ⁹	

7.3 Sequenz-Alignments der NCCR aller untersuchten Proben

Die NCCR-Sequenzen aller in Tabelle 16 in Abschnitt 5.5.3 dargestellten Proben wurden mit Hilfe des Programms ClustalW mit der Sequenz des Stamms WWM12 verglichen. Die im Vergleich zum WWM12-Stamm mutierten Basen wurden rot markiert. Bei 18 Experimenten wurde die Infektion der RPTEC mit dem WW-Stamm durchgeführt. Die im Vergleich zum WWM12 mutierte Base der WW-NCCR wurde gelb markiert.

Sequenzen 1 bis 10:

```

WWM12      TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTGTAGGCCTCAGAAA
Ex11      TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTGTAGGCCTCAGAAA
Ex7       TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTGTAGGCCTCAGAAA
Ex9       TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTGTAGGCCTCAGAAA
Ex12      TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTGTAGGCCTCAGAAA
Ex2       TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTGTAGGCCTCAGAAA
Ex3       TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTGTAGGCCTCAGAAA
Ex4       TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTGTAGGCCTCAGAAA
Ex5       TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTGTAGGCCTCAGAAA
Ex1       TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTGTAGGCCTCAGAAA
Ex6       TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTGTAGGCCTCAGAAA
*****

WWM12      AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAAGGGTGGAGGCCAGAGGCGGCCTCGGCCTCT
Ex11      AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAAGGGTGGAGGCCAGAGGCGGCCTCGGCCTCT
Ex7       AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAAGGGTGGAGGCCAGAGGCGGCCTCGGCCTCT
Ex9       AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAAGGGTGGAGGCCAGAGGCGGCCTCGGCCTCT
Ex12      AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAAGGGTGGAGGCCAGAGGCGGCCTCGGCCTCT
Ex2       AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAAGGGTGGAGGCCAGAGGCGGCCTCGGCCTCT
Ex3       AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAAGGGTGGAGGCCAGAGGCGGCCTCGGCCTCT
Ex4       AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAAGGGTGGAGGCCAGAGGCGGCCTCGGCCTCT
Ex5       AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAAGGGTGGAGGCCAGAGGCGGCCTCGGCCTCT
Ex1       AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAAGGGTGGAGGCCAGAGGCGGCCTCGGCCTCT
Ex6       AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAAGGGTGGAGGCCAGAGGCGGCCTCGGCCTCT
*****

```

WWM12 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
 Ex11 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
 Ex7 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
 Ex9 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
 Ex12 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
 Ex2 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
 Ex3 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
 Ex4 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
 Ex5 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
 Ex1 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
 Ex6 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA

WWM12 CCATGACCTCAGGAAGGAAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex11 CCATGACCTCAGGAAGGAAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex7 CCATGACCTCAGGAAGGAAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex9 CCATGACCTCAGGAAGGAAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex12 CCATGACCTCAGGAAGGAAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex2 CCATGACCTCAGGAAGGAAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex3 CCATGACCTCAGGAAGGAAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex4 CCATGACCTCAGGAAGGAAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex5 CCATGACCTCAGGAAGGAAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex1 CCATGACCTCAGGAAGGAAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex6 CCATGACCTCAGGAAGGAAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA

WWM12 AACCCCGCCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex11 AACCCCGCCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex7 AACCCCGCCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex9 AACCCCGCCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex12 AACCCCGCCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex2 AACCCCGCCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex3 AACCCCGCCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex4 AACCCCGCCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex5 AACCCCGCCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex1 AACCCCGCCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex6 AACCCCGCCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT

WWM12 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCCAGTTA
 Ex11 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCCAGTTA
 Ex7 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCCAGTTA
 Ex9 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCCAGTTA
 Ex12 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCCAGTTA
 Ex2 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCCAGTTA
 Ex3 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCCAGTTA
 Ex4 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCCAGTTA
 Ex5 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCCAGTTA
 Ex1 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCCAGTTA
 Ex6 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCCAGTTA

WWM12 AACTGGACAAAGGCC
 Ex11 AACTGGACAAAGGCC
 Ex7 AACTGGACAAAGGCC
 Ex9 AACTGGACAAAGGCC
 Ex12 AACTGGACAAAGGCC
 Ex2 AACTGGACAAAGGCC
 Ex3 AACTGGACAAAGGCC
 Ex4 AACTGGACAAAGGCC
 Ex5 AACTGGACAAAGGCC
 Ex1 AACTGGACAAAGGCC
 Ex6 AACTGGACAAAGGCC

Sequenzen 11 bis 19:

WWM12 TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
 Ex33 TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
 Ex35 TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
 Ex21 TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
 Ex27 TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
 Ex19 TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
 Ex17 TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
 Ex24 TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
 Ex26 TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
 Ex23 TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA

WWM12 AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGGCTCGGCCTCT
 Ex33 AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGGCTCGGCCTCT
 Ex35 AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGGCTCGGCCTCT
 Ex21 AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCAGAGGCGGCTCGGCCTCT
 Ex27 AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCAGAGGCGGCTCGGCCTCT
 Ex19 AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCAGAGGCGGCTCGGCCTCT
 Ex17 AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCAGAGGCGGCTCGGCCTCT
 Ex24 AAAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCAGAGGCGGCTCGGCCTCT
 Ex26 AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCAGAGGCGGCTCGGCCTCT
 Ex23 AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCAGAGGCGGCTCGGCCTCT
 ** ***** ** * * *****

WWM12 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
 Ex33 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
 Ex35 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
 Ex21 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
 Ex27 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
 Ex19 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
 Ex17 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
 Ex24 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
 Ex26 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
 Ex23 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
 *** *****

WWM12 CCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex33 CCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex35 CCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex21 CCTGACCTCAGGAAGTAAAGGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex27 CCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex19 CCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex17 CCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex24 CCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex26 CCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex23 CCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 ** ***** * **** ***** ** * * * *

WWM12 AACCCCGCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex33 AACCCCGCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex35 AACCCCGCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex21 AACCCCGCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex27 AACCCCGCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex19 AACCCCGCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex17 AACCCCGCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex24 AACCCCGCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex26 AACCCCGCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex23 AACCCCGCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 ***** ** * * *****


```

WWM12      GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTC CCCAGTTA
Ex33      GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTC CCCAGTTA
Ex35      GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTC CCCAGTTA
Ex21      GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTC CCCAGTTA
Ex27      GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTC CCCAGTTA
Ex19      GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTC CCCAGTTA
Ex17      GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTC CCCAGTTA
Ex24      GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTC CCCAGTTA
Ex26      GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTC CCCAGTTA
Ex23      GGAAAGCAGCCAAATAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTG CCCCAGT A
*****  ***** * ***** ***** *****

```

```

WWM12      AACTGGACAAAGGCC
Ex33      AACTGGACAAAGGCC
Ex35      AACTGGACAAAGGCC
Ex21      AACTGGACAAAGGCC
Ex27      AACTGGACAAAGGCC
Ex19      AACTGGACAAAGGCC
Ex17      AACTGGACAAAGGCC
Ex24      AACTGGACAAAGGCC
Ex26      AACTGGACAAAGGCC
Ex23      AACTGG AAAAGGCC
*****  *****

```

Sequenzen 20 bis 29:

```

Ex38      TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
Ex45      TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
Ex51      TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
WWM12     TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
Ex36      TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
Ex47      TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
Ex49      TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
Ex44      TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
Ex40      TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
Ex39      TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
Ex42      TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
*****

```

```

Ex38      AAAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGCCTCGGCCTCT
Ex45      AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGCCTCGGCCTCT
Ex51      AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGCCTCGGCCTCT
WWM12     AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGCCTCGGCCTCT
Ex36      AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGCCTCGGCCTCT
Ex47      AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGCCTCGGCCTCT
Ex49      AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGCCTCGGCCTCT
Ex44      AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGCCTCGGCCTCT
Ex40      AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGCCTCGGCCTCT
Ex39      AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGCCTCGGCCTCT
Ex42      AAGCCTCCCCCCTTACTCTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGCCTCGGCCTCT
** ***** * *****

```

```

Ex38      TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
Ex45      TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
Ex51      TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
WWM12     TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
Ex36      TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
Ex47      TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
Ex49      TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
Ex44      TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
Ex40      TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
Ex39      TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
Ex42      TAT TATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAAA
*** *****

```

Ex38 CCATGACCTCAGGAAGGAAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex45 CCATGACCTCAGGAAGGAAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex51 CCATGACCTCAGGAAGGAAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 WWM12 CCATGACCTCAGGAAGGAAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex36 CCATGACCTCAGGAAGGAAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex47 CCATGACCTCAGGAAGGAAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex49 CCATGACCTCAGGAAGGAAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex44 CCATGACCTCAGGAAGGAAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex40 CCATGACCTCAGGAAGGAAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex39 CCATGACCTCAGGAAGGAAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex42 CCATGACCTCAGGAAGGAAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA

Ex38 AACCCCGCCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex45 AACCCCGCCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex51 AACCCCGCCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 WWM12 AACCCCGCCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex36 AACCCCGCCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex47 AACCCCGCCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex49 AACCCCGCCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex44 AACCCCGCCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex40 AACCCCGCCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex39 AACCCCGCCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex42 AACCCCGCCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT

Ex38 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCTCCAGTGA
 Ex45 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCTCCAGTGA
 Ex51 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCTCCAGTGA
 WWM12 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCTCCAGTGA
 Ex36 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCTCCAGTGA
 Ex47 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCTCCAGTGA
 Ex49 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCTCCAGTGA
 Ex44 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCTCCAGTGA
 Ex40 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCTCCAGTGA
 Ex39 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCTCCAGTGA
 Ex42 GGAAAGCAGCCAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCTCCAGTGA

Ex38 AACTGGACAAAGGCC
 Ex45 AACTGGACAAAGGCC
 Ex51 AACTGGACAAAGGCC
 WWM12 AACTGGACAAAGGCC
 Ex36 AACTGGACAAAGGCC
 Ex47 AACTGGACAAAGGCC
 Ex49 AACTGGACAAAGGCC
 Ex44 AACTGGACAAAGGCC
 Ex40 AACTGGACAAAGGCC
 Ex39 AACTGGACAAAGGCC
 Ex42 AACTGGACAAAGGCC

Sequenzen 30 bis 39:

WWM12 TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
 Ex58 TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
 Ex74 TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
 Ex75 TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
 Ex65 TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
 Ex70 TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
 Ex62 TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
 Ex53 TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
 Ex56 TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
 Ex72 TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA

Ex71 TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAAATAGGGATTTCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA

WWM12 AAG-CCTCCACACCCCTTACTACTTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCTC
 Ex58 AAG-CCTCCACACCCCTTACTACTTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCTC
 Ex74 AAG-CCTCCACACCCCTTACTACTTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCTC
 Ex75 AAG-CCTCCACACCCCTTACTACTTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCTC
 Ex65 AAG-CCTCCACACCCCTTACTACTTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCTC
 Ex70 AAG-CCTCCACACCCCTTACTACTTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCTC
 Ex62 AAG-CCTCCACACCCCTTACTACTTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCTC
 Ex53 AAA-CCTCCACACCCCTTACTACTTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCTC
 Ex56 AAA-CCTCCACACCCCTTACTACTTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCTC
 Ex72 AAA-CCTCCACACCCCTTACTACTTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCTC
 Ex71 AAA-CCTCCACACCCCTTACTACTTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCTC
 ** *****

WWM12 TTATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAA
 Ex58 TTATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAA
 Ex74 TTATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAA
 Ex75 TTATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAA
 Ex65 TTATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAA
 Ex70 TTATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAA
 Ex62 TTATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAA
 Ex53 TTATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAA
 Ex56 TTATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAA
 Ex72 TTATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAA
 Ex71 TTATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCCATGGAATGTAGCCAA

WWM12 ACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTGAATAGTG
 Ex58 ACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTGAATAGTG
 Ex74 ACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTGAATAGTG
 Ex75 ACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTGAATAGTG
 Ex65 ACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTGAATAGTG
 Ex70 ACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTGAATAGTG
 Ex62 ACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTGAATAGTG
 Ex53 ACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTGAATAGTG
 Ex56 ACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTGAATAGTG
 Ex72 ACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTGAATAGTG
 Ex71 ACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTGAATAGTG

WWM12 AAACCCCGCCCCTAAAAATTTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAG
 Ex58 AAACCCCGCCCCTAAAAATTTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAG
 Ex74 AAACCCCGCCCCTAAAAATTTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAG
 Ex75 AAACCCCGCCCCTAAAAATTTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAG
 Ex65 AAACCCCGCCCCTAAAAATTTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAG
 Ex70 AAACCCCGCCCCTAAAAATTTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAG
 Ex62 AAACCCCGCCCCTAAAAATTTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAG
 Ex53 AAACCCCGCCCCTAAAAATTTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAG
 Ex56 AAACCCCGCCCCTAAAAATTTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAG
 Ex72 AAACCCCGCCCCTAAAAATTTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAG
 Ex71 AAACCCCGCCCCTAAAAATTTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAG

WWM12 TGGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCCAGTT
 Ex58 TGGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCCAGTT
 Ex74 TGGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCCAGTT
 Ex75 TGGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCCAGTT
 Ex65 TGGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCCAGTT
 Ex70 TGGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCCAGTT
 Ex62 TGGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCCAGTT
 Ex53 TGGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCCAGTT
 Ex56 TGGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCCCAGTT

Ex72 TGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCTCCAGTT
 Ex71 TGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCTCCAGTT

WWM12 AAACCTGGACAAAGGCC
 Ex58 AAACCTGGACAAAGGCC
 Ex74 AAACCTGGACAAAGGCC
 Ex75 AAACCTGGACAAAGGCC
 Ex65 AAACCTGGACAAAGGCC
 Ex70 AAACCTGGACAAAGGCC
 Ex62 AAACCTGGACAAAGGCC
 Ex53 AAACCTGGACAAAGGCC
 Ex56 AAACCTGGACAAAGGCC
 Ex72 AAACCTGGACAAAGGCC
 Ex71 AAACCTGGACAAAGGCC

Sequenzen 40 bis 44:

WWM12 TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
 Ex79 TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
 Ex77 TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
 Ex80 TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
 Ex76 TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA
 Ex78 TTTTGCAAAAATTGCAAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATATTTTTGCTAGGCCTCAGAAA

WWM12 AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGCCTCGGCCTCT
 Ex79 AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGCCTCGGCCTCT
 Ex77 AAACCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGCCTCGGCCTCT
 Ex80 AAACCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGCCTCGGCCTCT
 Ex76 AAACCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGCCTCGGCCTCT
 Ex78 AAGCCTCCACACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGCCTCGGCCTCT
 ** *****

WWM12 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCATGGAATGTAGCCAAA
 Ex79 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCATGGAATGTAGCCAAA
 Ex77 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCATGGAATGTAGCCAAA
 Ex80 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCATGGAATGTAGCCAAA
 Ex76 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCATGGAATGTAGCCAAA
 Ex78 TATATATTATAAAAAAAAAAGGCCACAGGGAGGAGCTGCTAACCATGGAATGTAGCCAAA

WWM12 CCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex79 CCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex77 CCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex80 CCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex76 CCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA
 Ex78 CCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGA

WWM12 AACCCCGCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex79 AACCCCGCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex77 AACCCCGCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex80 AACCCCGCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex76 AACCCCGCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT
 Ex78 AACCCCGCCCTAAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCAAAGGAGT

WWM12 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCTCCAGTTA
 Ex79 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCTCCAGTTA
 Ex77 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCTCCAGTTA
 Ex80 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCTCCAGTTA
 Ex76 GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCCTCCAGTTA

```

Ex78      GGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTC CCCAGTTA
          *****

WWM12     AACTGGACAAAGGCC
Ex79      AACTGGACAAAGGCC
Ex77      AACTGGACAAAGGCC
Ex80      AACTGGACAAAGGCC
Ex76      AACTGGACAAAGGCC
Ex78      AACTGGACAAAGGCC
          *****

```

7.4 Vorhergesagte AP-1 Bindestellen in NCCR-Sequenzen aus Vorarbeiten

Bindestellen für AP-1 wurden mit Hilfe von PROMO vorhergesagt. Die Bindestelle W wurde in den Sequenzen grün und die Bindestelle WD gelb markiert. Weitere vorhergesagte und in dieser Arbeit nicht untersuchte AP-1 Bindestellen wurden blau bzw. lila markiert.

>AP12UK1

```

TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCAAATAGTTTTGCTAGGCCTCAGAAAAGCCTCCAC
ACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCAGAGGCGGCCTCGGCCTCTTATATATTATAAAAAAAGG
CCACAGGGAGGAGCTGGAATGCAGTAGCCAAAGGAGTGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCG
AGGAATCTTGGCCTTGTC CCCAGTTAATACTGGACAAAGGCC

```

>AP12UK2

```

TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCAAATAGTTTTGCTAGGCCTCAGAAAAGCCTCCAC
ACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGTCCTCGGCCTCTTATATATTATAAAAAAAGG
CCACAGGGAGGAGCTGCTTTCCCATGGAATGCAGCCAAACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGG
GCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAAGTGAGTCACGACAAGGAGGAGCTGCTTTCCCATGGAATGCAGCCAA
CCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGC

```

>AP12UK5

```

TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCAAATAGTTTTGCTAGGCCTCAGAAAAGCCTCCAC
ACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCAGAGGCGGCCTCGGCCTCTTATATATTATAAAAAAAGG
GCCACAGGGAGGAGCTGCTTTCCCATGGAATGCAGCCAAACCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGAAACCCCG
CCCTTAGAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGAAAGTAGCCAAAGGAGTGAAAGCAGCCAGACAGG
CATGTTTTGCGAGCCGAGGAATCTTGGCCTTGTC CCCAGTTAATACTGGACAAAGGCC

```

>AP12UK6

```

TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCAAATAGTTTTGCTAGGCCTCAGAAAAGCCTCCAC
ACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCAGAGGCGGCCTCGGCCTCTTATATATTATAAAAAAAGG

```

GCCACAGGGAGGAGCTGCTTTCCCATGGAATGCAGCCAAACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGG
GGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGAAACCCCGCCGAGCCGAGGAATCTTGGCCTTGTCCCCAGTTAA
TACTGGACAAAGGCC

>AP12U12

TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATAGTTTTGCTAGGCCTCAGAAAAGCCTCCAC
ACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCAGAGGCGGCCTCGGCCTCTTATATATTATAAAAAAAAAGG
CCACAGGGAGGAGCTGCTTTCCCATGGAATGCAGCCAAACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGG
GCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAAGTGAGTCATGACAAGGAGGAGCTGCTTTCCCATGGAATGCAGCCAA
CCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGC

>AP12UK48

TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATAGTTTTGCTAGGCCTCAGAAAAGCCTCCACA
CCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCAGAGGCGGCCTCGGCCTCTTATATATTATAAAAAAAAAGG
CCACAGGGAGGAGCTGCTTACCCATGGAATGCAGCCAAACCGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGC
CAGTGGCAGTTAATAGTGAAACCCCGCCCTGAAATCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCC
AAAGGAGTGGAAAGCAGCCAGACAGAC

>AP12PK13

TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATAGTTTTGCTAGGCCTCAGAAAAGCCTCCAC
ACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCAGAGGCGGCCTCGGCCTCTTATATATTATAAAAAAAAAGG
CCACAGGGAGGAGCTGCTTTCCCATGGAATGCAGCCAAACCATGACCTCATTTCATGGAATGCAGCCAA
ACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGAAACCCCGCC
CTAGAATCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAAGTAGCCAAAGGAGTGGAAAGCAGCCAGACAGAC

>AP12PK23

TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATAGTTTTGCTAGGCCTCAGAAAAGCCTCCAC
ACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCAGAGGCGGCCTCGGCCTCTTATATATTATAAAAAAAAAGG
CCACAGGGAGGAGCTGCTTTCCCATGGAATGCAGCCAAACCATGACCTCATTTCATGGAATGCAGCCAA
ACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGC

>AP13U

TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATAGTTTTGCTAGGCCTCAGAAAAGCCTCCAC
ACCCTTGATTCTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCAGAGGGGCCTCGCCCTCTTATATTTATAAAAAAAAAGG
CCACAGGGAGGAGCTGCTTTCCCATGGAATGCAGCCAAACCATGACCTCAGGAAGGAAAGGCATGCCTGG
GCAGCCAACCAAGTGGCAGTCAATAGTGAAACCCCGCCCTAGAATCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGG

AAAGTACCCAAAGGAGGGGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCGAGGAATCTTGGCCTTGTC
CAGTTAATACTGGACAAAGGCC

>AP13UK20

TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCAAATAGTTTTGCTAGGCCTCAGAAAAGCCTCCAC
ACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCAGAGGCGGCCTCGGCCTCTTATATATTATAAAAAAAGG
CCACAGGGAGGAGCTGCTTTCCCATGGAATGCAGCCAAACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGG
GCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAAGTAGCCAAAGGAGTGGAAAGCAG
CCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCGAGGAATCTTGGCCTTGTCCTCCAGTTAATACTGGACAAAGGCC

>AP13UK24

TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCAAATAGTTTTGCTAGGCCTCAGAAAAGCCTCCAC
ACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCAGAGGCGGCCTCGGCCTCTTATATATTATAAAAAAAGG
CACAGGGAGGAGCTGCTTTCCCATGGAATGCAGCCAAACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGG
CAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGAGTCACGACAAGGAGGAGCTGCTTTCCCATGGAATGCAGCCAAAC
CATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGGGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGAGTCACGACAAG
TTCAGTGAAAGTTAATCACTAGTGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCAT

>AP13UK27

TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCAAATAGTTTTGCTAGGCCTCAGAAAAGCCTCCAC
ACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCAGAGGCGGCCTCGGCCTCTTATATATTATAAAAAAAGG
CCACAGGGAGGAGCTGCTTTCCCATGGAATGCAGCCAAACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGG
GCAGCCAGCCAAGAGGAAGTGGAAAGTAGCCAAAGGAGTGGAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGC
CGAGGAATCTTGGCCTTGTCCTCCAGTTAATACTGGACAAAGGCC

>AP13PK37

TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCAAATAGTTTTGCTAGGCCTCAGAAAAGCCTCCAC
ACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCAGAGGCGGCCTCGGCCTCTTATATATTATAAAAAAAGG
CCACAGGGAGGAGCTGCTTTCCCATGGAATGCAGCCAAACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGG
GCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGAGTC

>AP16UK32

TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCAAATAGTTTTGCTAGGCCTCAGAAAAGCCTCCAC
ACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCAGAGGCGGCCTCGGCCTCTTATATATTATAAAAAAAGG
GCCACAGGGAGGAGCTGCTTTCCCATGGAATGCAGCCAAACCATGACCTCAGGAAGGAAAGTGCATGACTGG

GGCAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATA GTGAGTCAC GACAAGGGGGAGCTGCTTTCCCATGGAATGCAGCCAA
ACC ATGACCTC AGGAAGGAAAGTGC

>AP16UK34

TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATAGTTTTGCTAGGCCTCAGAAAAGCCTCCAC
ACCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCAGAGGCGGCCTCGGCCTCTTATATATTATAAAAAAAGGC
CACAGGGAGGAGCTGCATTCTTTCCCATGGAATGCAGCCAAACC ATGACCTC AGGAAGGAAAGTGC ATGA
CTGGG CAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGAAACCCCGCCCCTAGAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAA
GTGAAAAGTAGCCAAAGGAGTGAAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGAGCCGAGGAATCTTGGCCTTG
TCCCCAGTTAATACTGGACAAAGGCC

>BW56U28

TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATAGTTTTGCTAGGCCTCAGAAAAGCCTCCACA
CCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCTCTTATATATTATAAAAAAAGGC
CACAGGGAGGAGCTGCTTACCCATGGAATGCAGCCAAACAGGAGGGAAAGTGC ATGACTTGG CAGCCAGCC
AGTGGCAGTTAATAGTGAAACCCCGCCCCTGAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCA
AAGGAGTGAAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGGGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCGCCAGTTAACT
GGACAAAGGCC

>BW56U29

TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATAGTTTTGCTAGGCCTCAGAAAAGCCTCCACA
CCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCTCTTATATATTATAAAAAAAGGCC
ACAGGGAGGAGCTGCTTACCCATGGAATGCAGCCAAACCAGGAAGGAAAGTGC ATGACTGGG CAGCCAGCC
AGTGGCAGTTAATAGTGAAACCCCGCCCCTGAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGAAACTGGCCA
AAGGAGTGAAAAGCAGCCAGACAGACATGTTTTGCGGGCCTAGGAATCTTGGCCTTGTCGCCAGTTAACT
GGACAAAGGCC

>BW56U38

TTTTGCAAAAATTGCAAAAGAATAGGGATTTCCCCAAATAGTTTTGCTAGGCCTCAGAAAAGCCTCCACA
CCCTTACTACTTGAGAGAAAGGGTGGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCTCTTATATATTATAAAAAAAGGC
CACAGGGAGGAGCTGCTTACCCATGGAATGCAGCCAAACC ATGACCTC AGGAAGGAAAGTGC ATGACTGGG
CAGCCAGCCAGTGGCAGTTAATAGTGAAACCCCGCCCCTGAAATTCTCAAATAAACACAAGAGGAAGTGGG
ACAAAGGCC

8 Verzeichnisse

8.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
A	Ampère
AKT	Proteinkinase B
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATF	<i>Activating transcription factor</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
ATRA	<i>All-trans</i> Retinsäure
Bex.	Bexaroten
BKIM	BK-Infektionsmedium
BKPyV	BK-Polyomavirus
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
C/EBP	<i>CCAAT/Enhancer-Binding-Protein</i>
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB-Bindeprotein
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDK1	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	Komplementäre DNA
cm ²	Quadratcentimeter
cm ³	Kubikcentimeter
CMV	Cytomegalievirus
Cox-2	Cyclooxygenase 2
CRE	<i>cAMP response element</i>
CT	Choleratoxin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dest.	Destilliert
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation</i>
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
Fen.	Fenretinid
FFU	<i>Fluorescence forming unit</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
Gäq	Genomäquivalent
GGT-1	Gamma-Glutamyltranspeptidase
HC	Hämorrhagische Zystitis
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPV	Humanes Papillomvirus
Hsp70	<i>Heat-shock protein 70</i>
HUV-EC-C	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
ICTV	Internationales Komitee für die Taxonomie von Viren
IE	Infektiöse Einheit
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IVIG	Intravenöse Immunglobuline

JCPyV	JC-Polyomavirus
JDP	<i>Jun dimerization protein</i>
JNK	Jun-N-terminale Kinase
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Molar
m	Milli/meter
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCPyV	Merkelzell-Polyomavirus
MDM2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
min	Minute
miRNA	microRNA
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MPyV	Maus-Polyomavirus
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
n	Nano
n. s.	Nicht signifikant
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCCR	<i>Non-coding Control Region</i>
NF-1	<i>Nuclear factor 1</i>
NF-kappaB	<i>Nuclear factor κB</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NLS	<i>Nuclear localization signal</i>
NPC	<i>Nuclear pore complex</i>
OBD	Ori-Bindedomäne
p	p-Wert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
PP2A	Proteinphosphatase 2A

pRb	Riboblastomprotein
PVAN	Polyomavirus-assoziierte Nephropathie
qRT-PCR	Quantitative Real time PCR
RANTES	<i>regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RAR	Retinsäure-Rezeptor
REBM	<i>Renal epithelial basal medium</i>
REGM	<i>Renal epithelial growth medium</i>
RIG	<i>Retinoic acid inducible gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPL13A	<i>60S ribosomal protein L13a</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RPTEC	<i>Renal proximal tubule epithelial cells</i>
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SI	Selektivitätsindex
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
Sp1	<i>Specificity protein 1</i>
SV40	<i>Simian Vacuolating Virus 40</i> <i>Macaca mulatta Polyomavirus 1</i>
TAg	Großes T-Antigen
tAg	Kleines T-Antigen
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEN	Tris-EDTA-Natriumchlorid
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TRE	<i>TPA response element</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
truncTAg	Trunkiertes T-Antigen
U	<i>Unit</i>

UKS	Universitätsklinikum des Saarlandes
ULBP3	<i>UL16 binding protein 3</i>
UPL	<i>Universal probe library</i>
V	Volt
VP	Virusprotein

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Genomaufbau des BKPyV.....	7
Abbildung 2: NCCR-Struktur verschiedener BKPyV Stämme.....	8
Abbildung 3: Übersicht über Bindestellen zellulärer Transkriptionsfaktoren in der NCCR des WWM12-Stamms.....	11
Abbildung 4: Domänen des großen T-Antigens.....	13
Abbildung 5: Kapsidaufbau des BKPyV.....	15
Abbildung 6: Schematische Übersicht über die Regulation des S-Phase-Übergangs.....	23
Abbildung 7: Gliederung der Retinoide in vier Generationen.....	24
Abbildung 8: Zeitlicher Ablauf der Infektionsversuche für Medikamententests.....	53
Abbildung 9: GGT1 Immunfluoreszenzfärbung von RPTEC.....	68
Abbildung 10: CD13 Nachweis auf RPTEC mittels Durchflusszytometrie.....	69
Abbildung 11: Vergleich der viralen Replikation in RPTEC in unterschiedlichem Medium.....	72
Abbildung 12: Vergleich der Replikation von WWT und M401 in RPTEC von Spender 1 und 2.....	74
Abbildung 13: Messung der Proteinexpression des TAg und des VP1 und Quantifizierung infizierter Zellen.....	76
Abbildung 14: Passagierbarkeit des Dunlop- und WWM12-Stamms.....	78
Abbildung 15: Elektronenmikroskopische Aufnahme WWM12 infizierter RPTEC.....	79
Abbildung 16: Effekt von Teriflunomid auf die Replikation des BKPyV und das Wachstum der RPTEC.....	81
Abbildung 17: Einfluss der WWM12-Infektion auf die Expression von Cyclin E1 und E2 und CDK1 und 2.....	83
Abbildung 18: Einfluss der Dunlop-Infektion auf die Expression von Cyclin E1 und E2 und CDK1 und 2.....	84
Abbildung 19: Effekt von Ro-3306 auf die Replikation des BKPyV und das Wachstum der RPTEC.....	85
Abbildung 20: Transformationsassay von RPTEC.....	87
Abbildung 21: Effekt von ATRA auf die Replikation des BKPyV und das Wachstum der RPTEC.....	88
Abbildung 22: Effekt von Acitretin auf die Replikation des BKPyV und das Wachstum der RPTEC.....	89
Abbildung 23: Effekt von Adapalen auf die Replikation des BKPyV und das Wachstum der RPTEC.....	90

Abbildung 24: Effekt von Bexaroten auf die Replikation des BKPyV und das Wachstum der RPTEC.....	91
Abbildung 25: Effekt von Fenretinid auf die Replikation des BKPyV und das Wachstum der RPTEC.....	92
Abbildung 26: Effekt von Fenretinid auf die Replikation des WWT und M401-Stamms.....	93
Abbildung 27: Kinetik des Effekts von Bexaroten und Fenretinid auf die Replikation des BKPyV.	94
Abbildung 28: Einfluss von Bexaroten und Fenretinid auf die Expression von Cyclin E1, E2, CDK1 und CDK2 in Dunlop infizierten Zellen.	96
Abbildung 29: Einfluss von Bexaroten und Fenretinid auf die Expression von Cyclin E1, E2, CDK1 und CDK2 in WWM12 infizierten Zellen.....	99
Abbildung 30: Vorausgesagte potenzielle Bindestellen für AP-1 in der NCCR von WWM12 und Dunlop.....	101
Abbildung 31: PMA-Induzierbarkeit der Proteinbindung an die Vorhergesagten DNA-Sequenzen.	102
Abbildung 32: Sequenzalignment der NCCR verschiedener archetypischer BKPyV-Stämme. .	104
Abbildung 33: Indirekter Einfluss von Bexaroten und Fenretinid auf die PMA-induzierte Proteinbindung der Bindestellen W und DII.	106
Abbildung 34: Direkter Einfluss von Bexaroten und Fenretinid auf die PMA-induzierte Proteinbindung der Bindestellen W und DII.	107
Abbildung 35: Indirekter Einfluss von Bexaroten und Fenretinid auf die Proteinbindung der Bindestellen W und DII in WWM12 infizierten Zellen.	108
Abbildung 36: Supershift-Analysen von WWM12 infizierten Zellen mit Antikörpern gegen verschiedene Komponenten von AP-1.	109
Abbildung 37: Hypothesen zum Mechanismus der inhibitorischen Wirkung von Bexaroten auf die Bindeaktivität von AP-1 an der NCCR.	130

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nomenklatur und Klassifizierung relevanter Polyomaviren.....	4
Tabelle 2: Liste aller in dieser Arbeit verwendeter Antikörper.	33
Tabelle 3: Primer, MgCl ₂ -Konzentration und verwendete UPL-Sonde für die cDNA PCR.....	34
Tabelle 4: DNA-Oligos zur Verwendung in EMSA.	35
Tabelle 5: Programm für die PCR zum Mykoplasmen-Nachweis.....	48
Tabelle 6: Übersicht über Zellzahl und Volumina bei der Kultivierung und Infektion von RPTEC.	51
Tabelle 7: PCR-Programm zur Durchführung der Nested PCRs.....	56
Tabelle 8: PCR-Programm zur Durchführung der quantitativen PCR zur Viruslastbestimmung.	57
Tabelle 9: PCR-Programm der quantitativen PCR zur Messung der Genexpression.....	60
Tabelle 10: Übersicht über alle in dieser Arbeit verwendeten Virusstocks.	70
Tabelle 11: Quantifizierung des WWM12 Stamms mit Hilfe des Fluorescent Focus Assays.....	71
Tabelle 12: Quantifizierung des Dunlop Stamms mit Hilfe des Fluorescent Focus assays.....	71
Tabelle 13: Gemessene Werte für die Zunahme der Viruslast der in Abbildung 11 gezeigten Experimente.....	72
Tabelle 14: Ergebnisse der Sequenzierung der NCCR aus Überständen WWM12 infizierter RPTEC.....	80
Tabelle 15: Übersicht über die Überstände der 293TT-Infektionen zur Anzucht des WWM12 Stamms.....	133
Tabelle 16: Übersicht über die Überstände der 293TT-Infektion zur Anzucht des WWT Stamms.	134
Tabelle 17: Übersicht über die Überstände der 293TT-Infektion zur Anzucht des M401 Stamms.	134
Tabelle 18: Übersicht über die Überstände der 293TT-Zellen zur Anzucht des Dunlop-Stamms.	135

8.4 Literaturverzeichnis

- Abend, JR; Low, JA; Imperiale, MJ (2007): Inhibitory effect of gamma interferon on BK virus gene expression and replication. *Journal of virology* 81 (1): 272–279.
- Abend, JR; Imperiale, MJ (2008): Transforming growth factor-beta-mediated regulation of BK virus gene expression. *Virology* 378 (1): 6–12.
- Abend, JR; Joseph, AE; Das, D; Campbell-Cecen, DB; Imperiale, MJ (2009): A truncated T antigen expressed from an alternatively spliced BK virus early mRNA. *The Journal of general virology* 90 (Pt 5): 1238–1245.
- Abend, JR; Low, JA; Imperiale, MJ (2010): Global effects of BKV infection on gene expression in human primary kidney epithelial cells. *Virology* 397 (1): 73–79.
- Aleem, E; Berthet, C; Kaldis, P (2004): Cdk2 as a master of S phase entry: fact or fake? *Cell cycle* 3 (1): 35–37.
- Aleem, E; Kiyokawa, H; Kaldis, P (2005): Cdc2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nature cell biology* 7 (8): 831–836.
- Ali, SH; Chandraker, A; DeCaprio, JA (2007): Inhibition of Simian virus 40 large T antigen helicase activity by fluoroquinolones. *Antiviral therapy* 12 (1): 1–6.
- Ambalathingal, GR; Francis, RS; Smyth, MJ; Smith, C; Khanna, R (2017): BK Polyomavirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Therapies. *Clinical microbiology reviews* 30 (2): 503–528.
- Angel, P; Imagawa, M; Chiu, R; Stein, B; Imbra, RJ; Rahmsdorf, HJ; Jonat, C; Herrlich, P; Karin, M (1987): Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49 (6): 729–739.
- Angel, P; Karin, M (1991): The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochimica et biophysica acta* 1072 (2-3): 129–157.
- Angel, P; Szabowski, A; Schorpp-Kistner, M (2001): Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene* 20 (19): 2413–2423.
- Appierto, V; Villani, MG; Cavadini, E; Lotan, R; Vinson, C; Formelli, F (2004): Involvement of c-Fos in fenretinide-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells. *Cell death and differentiation* 11 (3): 270–279.
- Aranda, A; Pascual, A (2001): Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological reviews* 81 (3): 1269–1304.
- Azzi, A; De Santis, R; Ciappi, S; Leoncini, F; Sterrantino, G; Marino, N; Mazzotta, F; Laszlo, D; Fanci, R; Bosi, A (1996): Human polyomaviruses DNA detection in peripheral blood leukocytes from immunocompetent and immunocompromised individuals. *Journal of neurovirology* 2 (6): 411–416.

- Baer, PC; Nockher, WA; Haase, W; Scherberich, JE (1997): Isolation of proximal and distal tubule cells from human kidney by immunomagnetic separation. Technical note. *Kidney international* 52 (5): 1321–1331.
- Baker, TS; Drak, J; Bina, M (1989): The capsid of small papova viruses contains 72 pentameric capsomeres: direct evidence from cryo-electron-microscopy of simian virus 40. *Biophysical journal* 55 (2): 243–253.
- Bakiri, L; Lallemand, D; Bossy-Wetzel, E; Yaniv, M (2000): Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *The EMBO journal* 19 (9): 2056–2068.
- Balmer, JE; Blomhoff, R (2002): Gene expression regulation by retinoic acid. *Journal of lipid research* 43 (11): 1773–1808.
- Banerji, J; Rusconi, S; Schaffner, W (1981): Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell* 27 (2 Pt 1): 299–308.
- Bauman, Y; Nachmani, D; Vitenshtein, A; Tsukerman, P; Drayman, N; Stern-Ginossar, N; Lankry, D; Gruda, R; Mandelboim, O (2011): An identical miRNA of the human JC and BK polyoma viruses targets the stress-induced ligand ULBP3 to escape immune elimination. *Cell host & microbe* 9 (2): 93–102.
- Benkoussa, M; Brand, C; Delmotte, M-H; Formstecher, P; Lefebvre, P (2002): Retinoic acid receptors inhibit AP1 activation by regulating extracellular signal-regulated kinase and CBP recruitment to an AP1-responsive promoter. *Molecular and cellular biology* 22 (13): 4522–4534.
- Bennett, SM; Broekema, NM; Imperiale, MJ (2012): BK polyomavirus: emerging pathogen. *Microbes and infection* 14 (9): 672–683.
- Bernhoff, E; Tylden, GD; Kjerpeseth, LJ; Gutteberg, TJ; Hirsch, HH; Rinaldo, CH (2010): Leflunomide inhibition of BK virus replication in renal tubular epithelial cells. *Journal of virology* 84 (4): 2150–2156.
- Bethge, T; Hachemi, HA; Manzetti, J; Gosert, R; Schaffner, W; Hirsch, HH (2015): Sp1 sites in the noncoding control region of BK polyomavirus are key regulators of bidirectional viral early and late gene expression. *Journal of virology* 89 (6): 3396–3411.
- Boehm, MF; Zhang, L; Badea, BA; White, SK; Mais, DE; Berger, E; Suto, CM; Goldman, ME; Heyman, RA (1994): Synthesis and structure-activity relationships of novel retinoid X receptor-selective retinoids. *Journal of medicinal chemistry* 37 (18): 2930–2941.
- Boldorini, R; Allegrini, S; Miglio, U; Paganotti, A; Cocca, N; Zaffaroni, M; Riboni F; Monga G; Viscidi R (2011): Serological evidence of vertical transmission of JC and BK polyomaviruses in humans. *The Journal of general virology* 92 (Pt 5): 1044–1050.

- Bollag, B; Chuke, WF; Frisque, RJ (1989): Hybrid genomes of the polyomaviruses JC virus, BK virus, and simian virus 40: identification of sequences important for efficient transformation. *Journal of virology* 63 (2): 863–872.
- Borowiec, JA; Hurwitz, J (1988): ATP stimulates the binding of simian virus 40 (SV40) large tumor antigen to the SV40 origin of replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (1): 64–68.
- Borriello, A; Pietra, VD; Criscuolo, M; Oliva, A; Tonini, GP; Iolascon, A; Zappia, V; Ragione, FD (2000): p27Kip1 accumulation is associated with retinoic-induced neuroblastoma differentiation: evidence of a decreased proteasome-dependent degradation. *Oncogene* 19 (1): 51–60.
- Bradford, MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248–254.
- Broekema, NM; Abend, JR; Bennett, SM; Butel, JS; Vanchiere, JA; Imperiale, MJ (2010): A system for the analysis of BKV non-coding control regions: application to clinical isolates from an HIV/AIDS patient. *Virology* 407 (2): 368–373.
- Broekema, NM; Imperiale, MJ (2012): Efficient propagation of archetype BK and JC polyomaviruses. *Virology* 422 (2): 235–241.
- Broekema, NM; Imperiale, MJ (2013): miRNA regulation of BK polyomavirus replication during early infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (20): 8200–8205.
- Buck, CB; Pastrana, DV; Lowy, DR; Schiller, JT (2004): Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *Journal of virology* 78 (2): 751–757.
- Caelles, C; González-Sancho, JM; Muñoz, A (1997): Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes & development* 11 (24): 3351–3364.
- Calvignac-Spencer, S; Feltkamp, MCW; Daugherty, MD; Moens, U; Ramqvist, T; Johne, R; Ehlers, B (2016): A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Archives of virology* 161 (6): 1739–1750.
- Camerini, T; Mariani, L; De Palo, G; Marubini, E; Di Mauro, MG; Decensi, A; Costa, A; Veronesi, U (2001): Safety of the synthetic retinoid fenretinide: long-term results from a controlled clinical trial for the prevention of contralateral breast cancer. *Journal of clinical oncology* 19 (6): 1664–1670.
- Carocci, M; Hinshaw, SM; Rodgers, MA; Villareal, VA; Burri, DJ; Pilankatta, R; Maharaj, NP; Gack, MU; Stavale, EJ; Warfield, KL; Yang, PL (2015): The bioactive lipid 4-hydroxyphenyl retinamide inhibits flavivirus replication. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 59 (1): 85–95.
- Carretero, G; Ribera, M; Belinchon, I; Carrascosa, JM; Puig, LI; Ferrandiz, C; Deheas, L; Vidal, D; Peral, F; Jorquera, E; González-Quesada, A; Muños, C; Notario, J; Vanaclocha, F; Moreno,

- JC; Psoriasis Group of the AEDV (2013): Guidelines for the use of acitretin in psoriasis. Psoriasis Group of the Spanish Academy of Dermatology and Venereology. *Actas dermatofiliograficas* 104 (7): 598–616.
- Carneiro, RV; Sotto, MN; Azevedo, LS; Ianhez, Luiz E; Rivitti, EA (2005): Acitretin and skin cancer in kidney transplanted patients. Clinical and histological evaluation and immunohistochemical analysis of lymphocytes, natural killer cells and Langerhans' cells in sun exposed and sun protected skin. *Clinical transplantation* 19 (1): 115–121.
- Cassill, JA; Deyerle, KL; Subramani, S (1989): Unidirectional deletion and linker scan analysis of the late promoter of the human papovavirus BK. *Virology* 169 (1): 172–181.
- Cazzaniga, M; Varricchio, C; Montefrancesco, C; Feroce, I; Guerrieri-Gonzaga, A (2012): Fenretinide (4-HPR): A Preventive Chance for Women at Genetic and Familial Risk? *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012.
- Chambon, P (1996): A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 10 (9): 940–954.
- Chellappan, S; Kraus, VB; Kroger B; Munger, K; Howley, PM; Phelps, WC; Nevins, JR (1992): Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (10): 4549–4553.
- Chen, L; Long, C; Nguyen, J; Kumar, D; Lee, J (2018): Discovering alkylamide derivatives of bexarotene as new therapeutic agents against triple-negative breast cancer. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 28 (3): 420-424.
- Chesters, PM; Heritage, J; McCance, DJ (1983): Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. *The Journal of infectious diseases* 147 (4): 676–684.
- Chigorno, V; Palestini, P; Sciannamblo, M; Dolo, V; Pavan, A; Tettamanti, G; Sonnino, S (2000): Evidence that ganglioside enriched domains are distinct from caveolae in MDCK II and human fibroblast cells in culture. *European journal of biochemistry* 267 (13): 4187–4197.
- Clayson, ET; Brando, LV; Compans, RW (1989): Release of simian virus 40 virions from epithelial cells is polarized and occurs without cell lysis. *Journal of virology* 63 (5): 2278–2288.
- Cohlan, SQ (1953): Excessive intake of vitamin A as a cause of congenital anomalies in the rat. *Science* 117 (3046): 535–536.
- Coombes, JL; Siddiqui, KRR; Arancibia-Carcamo, CV; Hall, J; Sun, C-M; Belkaid, Y; Powrie, F (2007): A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of experimental medicine* 204 (8): 1757–1764.

- Cooper, JP; Reynolds, CP; Cho, H; Kang, Min, H (2017): Clinical development of fenretinide as an antineoplastic drug: Pharmacology perspectives. *Experimental biology and medicine* 242 (11): 1178–1184.
- Cramer, PE; Cirrito, JR; Wesson, DW; Lee, CY; Karlo, JC; Zinn, AE; Casali, BT; Restivo, JL, Goebel, WD; James, MJ; Brunden, KR; Wilson, DA; Landreth, GE (2012): ApoE-directed therapeutics rapidly clear beta-amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science* 335 (6075): 1503–1506.
- Cras, A; Politis, B; Balitrand, N; Darsin-Bettinger, D; Boelle, PY; Cassinat, B; Toubert, ME; Chomienne, C (2012): Bexarotene via CBP/p300 induces suppression of NF-kappaB-dependent cell growth and invasion in thyroid cancer. *Clinical cancer research* 18 (2): 442–453.
- De Luca, LM; Ross, SA (1996): Retinoic acid response elements as positive and negative regulators of the expression of the homeobox b-1 gene. *Nutrition reviews* 54 (2 Pt 1): 61–63.
- DeCaprio, JA (2017): Merkel cell polyomavirus and Merkel cell carcinoma. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 372: 20160276.
- Delia, D; Aiello, A; Lombardi, L; Pelicci, PG; Grignani, F; Formelli, F; Menard, S; Costa, A, Veronesi, U; Pierotti, MA (1993): N-(4-hydroxyphenyl)retinamide induces apoptosis of malignant hemopoietic cell lines including those unresponsive to retinoic acid. *Cancer research* 53 (24): 6036–6041.
- Deyerle, KL; Subramani, S (1988): Linker scan analysis of the early regulatory region of human papovavirus BK. In: *Journal of virology* 62 (9): 3378–3387.
- Didonato, JA; Saatcioglu, F; Karin, M (1996): Molecular mechanisms of immunosuppression and anti-inflammatory activities by glucocorticoids. *American journal of respiratory and critical care medicine* 154 (2 Pt 2): 11-15.
- Doerries, K (2006): Human polyomavirus JC and BK persistent infection. *Advances in experimental medicine and biology* 577: 102–116.
- Dogra, S; Yadav, S (2014): Acitretin in psoriasis: an evolving scenario. *International journal of dermatology* 53 (5): 525–538.
- Drachenberg, CB; Papadimitriou, JC; Wali, R; Cubitt, CL; Ramos, E (2003): BK polyoma virus allograft nephropathy: ultrastructural features from viral cell entry to lysis. *American journal of transplantation* 3 (11): 1383–1392.
- Dragnev, KH; Petty, WJ; Shah, SJ; Lewis, LD; Black, CC; Memoli, V; Nugent, WC; Hermann, T; Negro-Vilar, A; Rigas, JR; Dmitrovsky, E (2007): A proof-of-principle clinical trial of bexarotene in patients with non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research* 13 (6): 1794–1800.

- Dragnev, KH; Whyman, JD; Hahn, CK; Kebbekus, PE; Kokko, SF; Bhatt, SM; Rigas, JR (2018): A phase I/II study of bexarotene with carboplatin and weekly paclitaxel for the treatment of patients with advanced non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic disease* 10 (9): 5531–5537.
- Dugan, Aisling S.; Eash, Sylvia; Atwood, Walter J. (2005): An N-linked glycoprotein with alpha(2,3)-linked sialic acid is a receptor for BK virus. *Journal of virology* 79 (22): 14442–14445.
- Durston, AJ; van der Wees, J; Pijnappel, WW; Schilthuis, JG; Godsave, SF (1997): Retinoid signalling and axial patterning during early vertebrate embryogenesis. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 53 (4): 339–349.
- Eash, S; Querbes, W; Atwood, WJ (2004): Infection of vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *Journal of virology* 78 (21): 11583–11590.
- Eash, S; Atwood, WJ (2005): Involvement of cytoskeletal components in BK virus infectious entry. *Journal of virology* 79 (18): 11734–11741.
- Eash, S; Manley, K; Gasparovic, M; Querbes, W; Atwood, WJ (2006): The human polyomaviruses. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 63 (7-8): 865–876.
- Eddy, BE; Stewart, SE; Berkeley, W (1958): Cytopathogenicity in tissue culture by a tumor virus from mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 98 (4): 848–851.
- el-Deiry, WS; Tokino, T; Velculescu, VE; Levy, DB; Parsons, R; Trent, JM; Lin, D; Mercer, WE; Kinzler, KW; Vogelstein, B (1993): WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75 (4): 817–825.
- Evans, GL; Caller, LG; Foster, V; Crump, CM (2015): Anion homeostasis is important for non-lytic release of BK polyomavirus from infected cells. *Open biology* 5 (8): 150041.
- Fanjul, AN; Delia, D; Pierotti, MA; Rideout, D; Yu, JQ; Pfahl, M (1996): 4-Hydroxyphenyl retinamide is a highly selective activator of retinoid receptors. *The Journal of biological chemistry* 271 (37): 22441–22446.
- Farasati, NA; Shapiro, R; Vats, A; Randhawa, P (2005): Effect of leflunomide and cidofovir on replication of BK virus in an in vitro culture system. *Transplantation* 79 (1): 116–118.
- Feng, H; Shuda, M; Chang, Y; Moore, PS (2008): Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 319 (5866): 1096–1100.
- Fernandes, ND; Sun, Y; Price, BD (2007): Activation of the kinase activity of ATM by retinoic acid is required for CREB-dependent differentiation of neuroblastoma cells. *The Journal of biological chemistry* 282 (22): 16577–16584.

- Flaegstad, T; Fredriksen, K; Dahl, B; Traavik, T; Rekvig, OP (1988): Inoculation with BK virus may break immunological tolerance to histone and DNA antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (21): 8171–8175.
- Fraser, JE; Wang, C; Chan, KWK; Vasudevan, SG; Jans, DA (2016): Novel dengue virus inhibitor 4-HPR activates ATF4 independent of protein kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinase and elevates levels of eIF2alpha phosphorylation in virus infected cells. *Antiviral research* 130: 1–6.
- Gaffney, EV; Pigott, D (1978): Hydrocortisone stimulation of human mammary epithelial cells. *In vitro* 14 (7): 621–624.
- Galderisi, U; Jori, FP; Giordano, A (2003): Cell cycle regulation and neural differentiation. *Oncogene* 22 (33): 5208–5219.
- Gardner, SD; Field, AM; Coleman, DV; Hulme, B (1971): New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *The Lancet* 1 (7712): 1253–1257.
- Gerits, N; Johannessen, M; Tümmeler, C; Walquist, M; Kostenko, S; Snapkov, I; van Loon, B; Ferrari, E; Hübscher, U; Moens, U (2015): Agnoprotein of polyomavirus BK interacts with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication. *Virology journal* 12: 7.
- Gonzalez, S; Escobar-Serna, DP; Suarez, O; Benavides, X; Escobar-Serna, JF; Lozano, E (2015): BK Virus Nephropathy in Kidney Transplantation: An Approach Proposal and Update on Risk Factors, Diagnosis, and Treatment. *Transplantation proceedings* 47 (6): 1777–1785.
- Gorrill, TS; Khalili, K (2005): Cooperative interaction of p65 and C/EBPbeta modulates transcription of BKV early promoter. *Virology* 335 (1): 1–9.
- Gosert, R; Rinaldo, CH; Funk, GA; Egli, A; Ramos, E; Drachenberg, CB; Hirsch, HH (2008): Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. *The Journal of experimental medicine* 205 (4): 841–852.
- Gottwein, E; Cullen, BR (2008): Viral and cellular microRNAs as determinants of viral pathogenesis and immunity. *Cell host & microbe* 3 (6): 375–387.
- Goudsmit, J; Wertheim-van Dillen, P; van Strien, A; van der Noordaa, J (1982): The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *Journal of medical virology* 10 (2): 91–99.
- Grant, GD; Cook, JG (2017): The Temporal Regulation of S Phase Proteins During G1. *Advances in experimental medicine and biology* 1042: 335–369.
- Griffith, JP; Griffith, DL; Rayment, I; Murakami, WT; Caspar, DL (1992): Inside polyomavirus at 25-A resolution. *Nature* 355 (6361): 652–654.
- Grinde, B; Gayorfar, M; Rinaldo, CH (2007): Impact of a polyomavirus (BKV) infection on mRNA expression in human endothelial cells. *Virus research* 123 (1): 86–94.

- Grinnell, BW; Berg, DT; Walls, JD (1988): Negative regulation of the human polyomavirus BK enhancer involves cell-specific interaction with a nuclear repressor. *Molecular and cellular biology* 8 (8): 3448–3457.
- Gross, L (1953): A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 83 (2): 414–421.
- Guasch, A; Roy-Chaudhury, P; Woodle, ES; Fitzsimmons, W; Holman, J; First, MR (2010): Assessment of efficacy and safety of FK778 in comparison with standard care in renal transplant recipients with untreated BK nephropathy. *Transplantation* 90 (8): 891–897.
- Guilbault, C; de Sanctis, JB; Wojewodka, G; Saeed, Z; Lachance, C; Skinner, TA; Vilela, RM; Kubow, S; Lands, LC; Hajduch, M; Matouk, E; Radzioch, D (2008): Fenretinide corrects newly found ceramide deficiency in cystic fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 38 (1): 47–56.
- Hail, N Jr; Kim, HJ; Lotan, R (2006): Mechanisms of fenretinide-induced apoptosis. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death* 11 (10): 1677–1694.
- Hall, JA.; Cannons, JL; Grainger, JR; Dos Santos, LM; Hand, TW; Naik, S; Wohlfert, EA; Chou, DB; Oldenhove, G; Robinson, M; Grigg, ME; Kastenmayer, R; Schwartzberg PL; Balkaid, Y (2011): Essential role for retinoic acid in the promotion of CD4(+) T cell effector responses via retinoic acid receptor alpha. *Immunity* 34 (3): 435–447.
- Hanssen Rinaldo, C; Hansen, H. Traavik, T (2005): Human endothelial cells allow passage of an archetypal BK virus (BKV) strain—a tool for cultivation and functional studies of natural BKV strains. *Archives of virology* 150 (7): 1449–1458.
- Hardin, J; Mydlarski, PR (2010): Systemic retinoids: chemoprevention of skin cancer in transplant recipients. *Skin therapy letter* 15 (7): 1–4.
- Harper, JW; Adami, GR; Wei, N; Keyomarsi, K; Elledge, SJ (1993): The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75 (4): 805–816.
- Harper, RA (1988): Specificity in the synergism between retinoic acid and EGF on the growth of adult human skin fibroblasts. *Experimental cell research* 178 (2): 254–263.
- Harris, KF; Christensen, JB; Imperiale, MJ (1996): BK virus large T antigen: interactions with the retinoblastoma family of tumor suppressor proteins and effects on cellular growth control. *Journal of virology* 70 (4): 2378–2386.
- Harris, RC; Chung, E; Coffey, RJ (2003): EGF receptor ligands. *Experimental cell research* 284 (1): 2–13.
- Hartwell, LH; Weinert, TA (1989): Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246 (4930): 629–634.

- He, K; Ravindran, MS; Tsai, B (2015): A bacterial toxin and a nonenveloped virus hijack ER-to-cytosol membrane translocation pathways to cause disease. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 50 (6): 477–488.
- Helle, F; Brochot, E; Handala, L; Martin, E; Castelain, S; Francois, C; Duverlie, G (2017): Biology of the BKPyV: An Update. *Viruses* 9 (11).
- Hess, J; Angel, P; Schorpp-Kistner, M (2004): AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *Journal of cell science* 117 (Pt 25): 5965–5973.
- Hinds, PW; Mitnacht, S; Dulic, V; Arnold, A; Reed, SI; Weinberg, RA (1992): Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* 70 (6): 993–1006.
- Hirsch, HH.; Steiger, J (2003): Polyomavirus BK. *The Lancet. Infectious diseases* 3 (10): 611–623.
- Hirsch, HH; Yakhontova, K; Lu, M; Manzetti, J (2016): BK Polyomavirus Replication in Renal Tubular Epithelial Cells Is Inhibited by Sirolimus, but Activated by Tacrolimus Through a Pathway Involving FKBP-12. *American journal of transplantation* 16 (3): 821–832.
- Ho, WZ; Cherukuri, R; Ge, SD; Cutilli, JR; Song, L; Whitko, S; Douglas, SD (1993): Centrifugal enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection and human cytomegalovirus gene expression in human primary monocyte/macrophages in vitro. *Journal of leukocyte biology* 53 (2): 208–212.
- Houben, R; Shuda, M; Weinkam, R; Schrama, D; Feng, H; Chang, Y; Moore, PS; Becker, JC (2010): Merkel cell polyomavirus-infected Merkel cell carcinoma cells require expression of viral T antigens. *Journal of virology* 84 (14): 7064–7072.
- Howley, PM; Mullarkey, MF; Takemoto, KK; Martin, MA (1975): Characterization of human papovavirus BK DNA. *Journal of virology* 15 (1): 173–181.
- Hurdiss, DL; Morgan, EL; Thompson, RF; Prescott, EL; Panou, MM; Macdonald, A; Ranson, NA (2016): New Structural Insights into the Genome and Minor Capsid Proteins of BK Polyomavirus using Cryo-Electron Microscopy. *Structure* 24 (4): 528–536.
- Imperiale, MJ; Jiang, M (2016): Polyomavirus Persistence. *Annual review of virology* 3 (1): 517–532.
- Jackson, V; Chalkley, R (1981): Use of whole-cell fixation to visualize replicating and maturing simian virus 40: identification of new viral gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (10): 6081–6085.
- Jeffers-Francis, LK; Burger-Calderon, R; Webster-Cyriaque, J (2015): Effect of Leflunomide, Cidofovir and Ciprofloxacin on replication of BKPyV in a salivary gland in vitro culture system. *Antiviral research* 118: 46–55.

- Jiang, D; Srinivasan, A; Lozano, G; Robbins, PD (1993): SV40 T antigen abrogates p53-mediated transcriptional activity. *Oncogene* 8 (10): 2805–2812.
- Jiang, M; Abend, JR; Tsai, B; Imperiale, MJ (2009a): Early events during BK virus entry and disassembly. *Journal of virology* 83 (3): 1350–1358.
- Jiang, M; Abend, JR; Johnson, SF; Imperiale, MJ (2009b): The role of polyomaviruses in human disease. *Virology* 384 (2): 266–273.
- Jiang, M; Zhao, L; Gamez, M; Imperiale, MJ (2012): Roles of ATM and ATR-mediated DNA damage responses during lytic BK polyomavirus infection. *PLoS pathogens* 8 (8): e1002898.
- Johne, R; Buck, CB; Allander, T; Atwood, WJ; Garcea, RL; Imperiale, MJ; Major, EO; Ramqvist, T; Norkin, LC (2011): Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Archives of virology* 156 (9): 1627–1634.
- Karin, M (1995): The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *The Journal of biological chemistry* 270 (28): 16483–16486.
- Khalil, S; Bardawil, T; Stephan, C; Darwiche, N; Abbas, O; Kibbi, AG; Nemer, G; Kurban, M (2017): Retinoids: a journey from the molecular structures and mechanisms of action to clinical uses in dermatology and adverse effects. *The Journal of dermatological treatment* 28 (8): 684–696.
- Khan, MA; Jenkins, GR; Tolleson, WH; Creek, KE; Pirisi, L (1993): Retinoic acid inhibition of human papillomavirus type 16-mediated transformation of human keratinocytes. *Cancer research* 53 (4): 905–909.
- Kim, M-S; Lee, S; Rho, HS; Kim, DH; Chang, IS; Chung, JH (2005): The effects of a novel synthetic retinoid, seletinoid G, on the expression of extracellular matrix proteins in aged human skin in vivo. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 362 (1-2): 161–169.
- Kishimoto, T; Okumura, E (1997): In vivo regulation of the entry into M-phase: initial activation and nuclear translocation of cyclin B/Cdc2. *Progress in cell cycle research* 3: 241–249.
- Kligman, AM; Fulton, JE Jr; Plewig, G (1969): Topical vitamin A acid in acne vulgaris. *Archives of dermatology* 99 (4): 469–476.
- Knowles, WA (2006): Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BK virus (BKV) and JC virus (JCV). *Advances in experimental medicine and biology* 577: 19–45.
- Koff, A; Cross, F; Fisher, A; Schumacher, J; Leguellec, K; Philippe, M; Roberts, JM (1991): Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell* 66 (6): 1217–1228.
- Kong, G; Kim, H-T; Wu, K; DeNardo, D; Hilsenbeck, SG; Xu, X-C; Lamph, WW; Bissonnette, R; Dannenberg, AJ; Brown PH (2005): The retinoid X receptor-selective retinoid, LGD1069, down-regulates cyclooxygenase-2 expression in human breast cells through transcription

- factor crosstalk: implications for molecular-based chemoprevention. *Cancer research* 65 (8): 3462–3469.
- Krisl, JC; Taber, DJ; Pilch, N; Chavin, K; Bratton, C; Thomas, B; McGillicuddy, J; Baliga P (2012): Leflunomide efficacy and pharmacodynamics for the treatment of BK viral infection. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 7 (6): 1003–1009.
- Lane, DP; Crawford, LV (1979): T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278 (5701): 261–263.
- Larange, A; Cheroutre, H (2016): Retinoic Acid and Retinoic Acid Receptors as Pleiotropic Modulators of the Immune System. *Annual review of immunology* 34: 369–394.
- Lechner, MS; Mack, DH; Finicle, AB; Crook, T; Vousden, KH; Laimins, LA (1992): Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *The EMBO journal* 11 (8): 3045–3052.
- Lee, W; Mitchell, P; Tjian, R (1987): Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* 49 (6): 741–752.
- Levicán, J; Acevedo, M; León, O; Gaggero, A; Aguayo, F (2018): Role of BK human polyomavirus in cancer. *Infectious agents and cancer* 13: 12.
- Li, R; Faria, TN; Boehm, M; Nabel, EG; Gudas, LJ. (2004): Retinoic acid causes cell growth arrest and an increase in p27 in F9 wild type but not in F9 retinoic acid receptor beta2 knockout cells. In: *Experimental cell research* 294 (1): 290–300.
- Li, R; Sharma, BN; Linder, S; Gutteberg, TJ; Hirsch, HH; Rinaldo, CH (2013): Characteristics of polyomavirus BK (BKPyV) infection in primary human urothelial cells. *Virology* 440 (1): 41–50.
- Li, Y; Shen, Q; Kim, H-T; Bissonnette, RP; Lamph, WW; Yan, B; Brown, PH (2011): The rexinoid bexarotene represses cyclin D1 transcription by inducing the DEC2 transcriptional repressor. *Breast cancer research and treatment* 128 (3): 667–677.
- Liang, B; Tikhanovich, I; Nasheuer, HP; Folk, WR (2012): Stimulation of BK virus DNA replication by NFI family transcription factors. *Journal of virology* 86 (6): 3264–3275.
- Liu, M; Iavarone, A; Freedman, LP (1996): Transcriptional activation of the human p21(WAF1/CIP1) gene by retinoic acid receptor. Correlation with retinoid induction of U937 cell differentiation. *The Journal of biological chemistry* 271 (49): 31723–31728.
- Liu, Y; Li, R; Ladisch, S (2004): Exogenous ganglioside GD1a enhances epidermal growth factor receptor binding and dimerization. *The Journal of biological chemistry* 279 (35): 36481–36489.
- Livak, KJ; Schmittgen, TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25 (4): 402–408.

- Low, JA; Magnuson, B; Tsai, B; Imperiale, MJ (2006): Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *Journal of virology* 80 (3): 1361–1366.
- Luo, C; Bueno, M; Kant, J; Randhawa, P (2008): Biologic diversity of polyomavirus BK genomic sequences: Implications for molecular diagnostic laboratories. *Journal of medical virology* 80 (10): 1850–1857.
- Luo, C; Hirsch, HH; Kant, J; Randhawa, P (2012): VP-1 quasispecies in human infection with polyomavirus BK. *Journal of medical virology* 84 (1): 152–161.
- Madshus, IH; Stang, E (2009): Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking. *Journal of cell science* 122 (Pt 19): 3433–3439.
- Mangelsdorf, DJ; Ong, ES; Dyck, JA; Evans, RM (1990): Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 345 (6272): 224–229.
- Mariani, O; Brennetot, C; Coindre, J-M; Gruel, N; Ganem, C; Delattre, O; Stern, MH; Aurias, A (2007): JUN oncogene amplification and overexpression block adipocytic differentiation in highly aggressive sarcomas. *Cancer cell* 11 (4): 361–374.
- Markowitz, RB; Dynan, WS (1988): Binding of cellular proteins to the regulatory region of BK virus DNA. *Journal of virology* 62 (9): 3388–3398.
- Marshall, H; Nonchev, S; Sham, MH; Muchamore, I; Lumsden, A; Krumlauf, R (1992): Retinoic acid alters hindbrain Hox code and induces transformation of rhombomeres 2/3 into a 4/5 identity. *Nature* 360 (6406): 737–741.
- Maru, S; Jin, G; Desai, D; Amin, S; Shwetank; Lauver, MD; Lukacher, AE (2017): Inhibition of Retrograde Transport Limits Polyomavirus Infection In Vivo. *mSphere* 2: e00494-17.
- Means, AL; Gudas, LJ (1995): The roles of retinoids in vertebrate development. *Annual review of biochemistry* 64: 201–233.
- Meneguzzi, G; Pignatti, PF; Barbanti-Brodano, G; Milanese, G (1978): Minichromosome from BK virus as a template for transcription in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75 (3): 1126–1130.
- Menter, A; Korman, NJ; Elmets, CA; Feldman, SR; Gelfand, JM; Gordon, KB; Gottlieb, AB; Koo, JY; Lebwohl, M; Lim, HW; Van Voorhees, AS; Beutner, KR; Bhushan, R (2009): Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: section 4. Guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with traditional systemic agents. *Journal of the American Academy of Dermatology* 61 (3): 451–485.
- Moens, U; Sundsfjord, A; Flaegstad, T; Traavik, T (1990): BK virus early RNA transcripts in stably transformed cells: enhanced levels induced by dibutyryl cyclic AMP, forskolin and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate treatment. *The Journal of general virology* 71 (Pt 7): 1461–1471.

- Moens, U; Johansen, T; Johnsen, JI; Seternes, OM; Traavik, T (1995): Noncoding control region of naturally occurring BK virus variants: sequence comparison and functional analysis. *Virus genes* 10 (3): 261–275.
- Monaco, MC; Jensen, PN; Hou, J; Durham, LC; Major, EO (1998): Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: evidence for site of initial viral infection. *Journal of virology* 72 (12): 9918–9923.
- Moriyama, T; Marquez, JP; Wakatsuki, T; Sorokin, A (2007): Caveolar endocytosis is critical for BK virus infection of human renal proximal tubular epithelial cells. *Journal of virology* 81 (16): 8552–8562.
- Moriyama, T; Sorokin, A (2008): Intracellular trafficking pathway of BK Virus in human renal proximal tubular epithelial cells. In: *Virology* 371 (2), 336–349.
- Moriyama, T; Sorokin, A (2009): BK virus (BKV): infection, propagation, quantitation, purification, labeling, and analysis of cell entry. *Current protocols in cell biology* Chapter 26, Unit 26.2.
- Mukherjee, S; Date, A; Patravale, V; Korting, HC; Roeder, A; Weindl, G (2006): Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. *Clinical Interventions in Aging* 1 (4): 327–348.
- Nakayama, T; Higuchi, T; Oiso, N; Kawada, A; Yoshie, O (2012): Expression and function of FRA2/JUND in cutaneous T-cell lymphomas. *Anticancer research* 32 (4): 1367–1373.
- Nieto-Rementeria, N; Perez-Yarza, G; Boyano, MD; Apraiz, A; Izu, R; Diaz-Perez, JL; Asumendi, A (2009): Bexarotene activates the p53/p73 pathway in human cutaneous T-cell lymphoma. *The British journal of dermatology* 160 (3): 519–526.
- Nilsson, J; Miyazaki, N; Xing, L; Wu, B; Hammar, L; Li, TC; Takeda, N; Miyamura, T; Cheng, RH (2005): Structure and assembly of a T=1 virus-like particle in BK polyomavirus. *Journal of virology* 79 (9): 5337–5345.
- Niu, X; Cao, W; Ma, H; Feng, J; Li, X; Zhang, X (2012): Acitretin exerted a greater influence on T-helper (Th)1 and Th17 than on Th2 cells in treatment of psoriasis vulgaris. *The Journal of dermatology* 39 (11): 916–921.
- Nomura, S; Khoury, G; Jay, G (1983): Subcellular localization of the simian virus 40 agnoprotein. *Journal of virology* 45 (1): 428–433.
- Normanno, N; De Luca, A; Bianco, C; Strizzi, L; Mancino, M; Maiello, MR; Carotenuto, A; De Feo, G; Caponigro, F; Salomon, DS (2006): Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 366 (1): 2–16.
- Nowock, J; Borgmeyer, U; Puschel, AW; Rupp, RA; Sippel, AE (1985): The TGGCA protein binds to the MMTV-LTR, the adenovirus origin of replication, and the BK virus enhancer. *Nucleic acids research* 13 (6): 2045–2061.

- Okada, N; Kitano, Y; Ichihara, K (1982): Effects of cholera toxin on proliferation of cultured human keratinocytes in relation to intracellular cyclic AMP levels. *The Journal of investigative dermatology* 79 (1): 42–47.
- Oldak, M; Maksym, RB; Sperling, T; Yaniv, M; Smola, H; Pfister, HJ; Malejczyk, J; Smola, S (2010): Human papillomavirus type 8 E2 protein unravels JunB/Fra-1 as an activator of the beta4-integrin gene in human keratinocytes. *Journal of virology* 84 (3): 1376–1386.
- Oridate, N; Suzuki, S; Higuchi, M; Mitchell, MF; Hong, WK; Lotan, R (1997): Involvement of reactive oxygen species in N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in cervical carcinoma cells. *Journal of the National Cancer Institute* 89 (16): 1191–1198.
- Ortiz, A; Justo, P; Sanz, A; Melero, R; Caramelo, C; Guerrero, MF; Strutz, F; Müller, G; Barat, A; Egido, J (2005): Tubular cell apoptosis and cidofovir-induced acute renal failure. *Antiviral therapy* 10 (1): 185–190.
- Padgett, BL; Walker, DL; ZuRhein, GM; Eckroade, RJ; Dessel, BH (1971): Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. In: *The Lancet* 1 (7712): 1257–1260.
- Panou, M-M; Prescott, EL; Hurdiss, DL; Swinscoe, G; Hollinshead, M; Caller, LG; Morgan, EL; Carlisle, L; Müller, M; Antoni, M; Kealy, D; Ranson, NA; Crump, CM; Macdonald, A (2018): Agnoprotein Is an Essential Egress Factor during BK Polyomavirus Infection. *International journal of molecular sciences* 19 (3).
- Passegue, E; Wagner, EF (2000): JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *The EMBO journal* 19 (12), 2969–2979.
- Pastrana, DV; Ray, U; Magaldi, TG; Schowalter, RM; Cuburu, N; Buck, CB (2013): BK polyomavirus genotypes represent distinct serotypes with distinct entry tropism. *Journal of virology* 87 (18): 10105–10113.
- Perry, CF; Stevens, M; Rabie, I; Yarker, M-E; Cochrane, J; Perry, E; Traficante, R; Coman, W (2005): Chemoprevention of head and neck cancer with retinoids: a negative result. *Archives of otolaryngology - head & neck surgery* 131 (3): 198–203.
- Petkovich, M; Brand, NJ; Krust, A; Chambon, P (1987): A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330 (6147): 444–450.
- Pitts, JD; Li, P-C; de Wispelaere, M; Yang, PL (2017): Antiviral activity of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR) against Zika virus. *Antiviral research* 147: 124–130.
- Poulin, DL; DeCaprio, JA (2006): Is there a role for SV40 in human cancer? *Journal of clinical oncology* 24 (26): 4356–4365.
- Querfeld, C; Nagelli, LV; Rosen, ST; Kuzel, TM; Guitart, J (2006): Bexarotene in the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Expert opinion on pharmacotherapy* 7 (7): 907–915.

- Ramos, E; Drachenberg, CB; Wali, R; Hirsch, HH (2009): The decade of polyomavirus BK-associated nephropathy: state of affairs. *Transplantation* 87 (5): 621–630.
- Randhawa, PS (2005): Anti-BK virus activity of ciprofloxacin and related antibiotics. *Clinical infectious diseases* 41 (9): 1366-7; author reply 1367.
- Randhawa, P; Pastrana, DV; Zeng, G; Huang, Y; Shapiro, R; Sood, P; Puttarajappa, C; Berger, M; Hariharan, S; Buck, CB (2015): Commercially available immunoglobulins contain virus neutralizing antibodies against all major genotypes of polyomavirus BK. *American journal of transplantation* 15 (4): 1014–1020.
- Resnick, J; Shenk, T (1986): Simian virus 40 agnoprotein facilitates normal nuclear location of the major capsid polypeptide and cell-to-cell spread of virus. *Journal of virology* 60 (3): 1098–1106.
- Rezzonico, R; Loubat, A; Lallemand, D; Pfarr, CM; Far, DF; Proudfoot, A; Rossi, B; Ponzio, G (1995): Cyclic AMP stimulates a JunD/Fra-2 AP-1 complex and inhibits the proliferation of interleukin-6-dependent cell lines. *Oncogene* 11 (6): 1069–1078.
- Rinaldo, CH; Traavik, T; Hey, A (1998): The agnogene of the human polyomavirus BK is expressed. *Journal of virology* 72 (7): 6233–6236.
- Rinaldo, CH; Gosert, R; Bernhoff, E; Finstad, S; Hirsch, HH (2010): 1-O-hexadecyloxypropyl cidofovir (CMX001) effectively inhibits polyomavirus BK replication in primary human renal tubular epithelial cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54 (11): 4714–4722.
- Rinaldo, CH; Tylden, GD; Sharma, BN (2013): The human polyomavirus BK (BKPvV): virological background and clinical implications. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 121 (8): 728–745.
- Ross, SA; McCaffery, PJ; Drager, UC; De Luca, LM (2000): Retinoids in embryonal development. *Physiological reviews* 80 (3): 1021–1054.
- Rubinstein, R; Pare, N; Harley, EH (1987): Structure and function of the transcriptional control region of nonpassaged BK virus. *Journal of virology* 61 (5): 1747–1750.
- Rubinstein, R; Schoonakker, BC; Harley, EH (1991): Recurring theme of changes in the transcriptional control region of BK virus during adaptation to cell culture. *Journal of virology* 65 (3): 1600–1604.
- Russell, JK; Blalock, JE (1984): Vitamin A inhibition of polyoma virus replication. *Biochemical and biophysical research communications* 122 (2): 851–858.
- Salazar-Roa, M; Malumbres, M (2017): Fueling the Cell Division Cycle. *Trends in cell biology* 27 (1): 69–81.
- Salbert, G; Fanjul, A; Piedrafita, FJ; Lu, XP; Kim, SJ; Tran, P; Pfahl, M (1993): Retinoic acid receptors and retinoid X receptor-alpha down-regulate the transforming growth factor-beta 1 promoter by antagonizing AP-1 activity. *Molecular endocrinology* 7 (10): 1347–1356.

- Schelhaas, M; Shah, B; Holzer, M; Blattmann, P; Kuhling, L; Day, PM; Schiller, JT; Helenius, A (2012): Entry of human papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis. *PLoS pathogens* 8 (4): e1002657.
- Schmitt, C; Raggub, L; Linnenweber-Held, S; Adams, O; Schwarz, A; Heim, A (2014): Donor origin of BKV replication after kidney transplantation. *Journal of clinical virology* 59 (2): 120–125.
- Schreiber, E; Matthias, P; Müller, MM; Schaffner, W (1989): Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic acids research* 17 (15): 6419.
- Schreiber, M; Kolbus, A; Piu, F; Szabowski, A; Mohle-Steinlein, U; Tian, J; Karin, M; Angel, P; Wagner, EF (1999): Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes & development* 13 (5): 607–619.
- Schüle, R; Rangarajan, P; Yang, N; Kliwer, S; Ransone, LJ; Bolado, J; Verma, IM; Evans, RM (1991): Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (14): 6092–6096.
- Seamone, ME; Wang, W; Acott, P; Beck, PL; Tibbles, LA; Muruve, DA (2010): MAP kinase activation increases BK polyomavirus replication and facilitates viral propagation in vitro. *Journal of virological methods* 170 (1-2): 21–29.
- Seif, I; Khoury, G; Dhar, R (1979): The genome of human papovavirus BKV. *Cell* 18 (4): 963–977.
- Sener, A; House, AA; Jevnikar, AM; Boudville, N; McAlister, VC; Muirhead, N; Rehman, F; Luke, PP (2006): Intravenous immunoglobulin as a treatment for BK virus associated nephropathy: one-year follow-up of renal allograft recipients. *Transplantation* 81 (1): 117–120.
- Seo, GJ; Fink, LHL; O'Hara, B; Atwood, WJ; Sullivan, CS (2008): Evolutionarily conserved function of a viral microRNA. *Journal of virology* 82 (20): 9823–9828.
- Shahzad, N; Shuda, M; Gheit, T; Kwun, HJ; Cornet, I; Saidj, D; Zannetti, C; Hasan, U; Chang, Y; Moore, PS; Accardi, R; Tommasinom M (2013): The T antigen locus of Merkel cell polyomavirus downregulates human Toll-like receptor 9 expression. *Journal of virology* 87 (23): 13009–13019.
- Shaulian, E (2010): AP-1--The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cellular signalling* 22 (6): 894–899.
- Sheikh, MS; Shao, ZM; Li, XS; Ordonez, JV; Conley, BA; Wu, S; Dawson, MI; Han, QX; Chao, WR; Quick, T; Niles, RM; Fontana, JA (1995): N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR)-mediated biological actions involve retinoid receptor-independent pathways in human breast carcinoma. *Carcinogenesis* 16 (10): 2477–2486.
- Shi, X-N; Li, H; Yao, H; Liu, X; Li, L; Leung, K-S; Kung, HF; Lin, MC (2015): Adapalene inhibits the activity of cyclin-dependent kinase 2 in colorectal carcinoma. *Molecular medicine reports* 12 (5): 6501–6508.

- Skoczylas, C; Fahrbach, KM; Rundell, K (2004): Cellular targets of the SV40 small-t antigen in human cell transformation. *Cell cycle* 3 (5): 606–610.
- Soye, KJ; Trottier, C; Di Lenardo, TZ; Restori, KH; Reichman, L; Miller, WH; Ward, BJ (2013): In vitro inhibition of mumps virus by retinoids. *Virology journal* 10: 337.
- Soye, KJ; Trottier, C; Richardson, CD; Ward, BJ; Miller, WH (2011): RIG-I is required for the inhibition of measles virus by retinoids. *PLoS one* 6 (7).
- Spooner, RA; Smith, DC; Easton, AJ; Roberts, LM; Lord, JM (2006): Retrograde transport pathways utilised by viruses and protein toxins. *Virology journal* 3, 26.
- Stern-Ginossar, N; Elefant, N; Zimmermann, A; Wolf, DG; Saleh, N; Biton, M; Horwitz, E; Prokocimer, Z; Prichard, M; Hahn, G; Goldman-Wohl, D; Greenfield, C; Yagel, S; Hengel, H; Altuvia, Y; Margalit, H; Mandelboim, O (2007): Host Immune System Gene Targeting by a Viral miRNA. *Science* 317 (5836): 376–381.
- Sugimoto, C; Hara, K; Taguchi, F; Yogo, Y (1990): Regulatory DNA sequence conserved in the course of BK virus evolution. *Journal of molecular evolution* 31 (6): 485–492.
- Sullivan, CS; Baker, AE; Pipas, JM (2004): Simian virus 40 infection disrupts p130-E2F and p107-E2F complexes but does not perturb pRb-E2F complexes. *Virology* 320 (2): 218–228.
- Sun, SY; Li, W; Yue, P; Lippman, SM; Hong, WK; Lotan, R (1999): Mediation of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in human cancer cells by different mechanisms. *Cancer research* 59 (10): 2493–2498.
- Sundsford, A; Johansen, T; Flaegstad, T; Moens, U; Villand, P; Subramani, S; Traavik, T (1990): At least two types of control regions can be found among naturally occurring BK virus strains. *Journal of virology* 64 (8): 3864–3871.
- Supino, R; Crosti, M; Clerici, M; Warlters, A; Cleris, L; Zunino, F; Formelli, F (1996): Induction of apoptosis by fenretinide (4HPR) in human ovarian carcinoma cells and its association with retinoic acid receptor expression. *International journal of cancer* 65 (4): 491–497.
- Sweet, BH; Hilleman, MR (1960): The vacuolating virus, S.V. 40. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 105: 420–427.
- Talmage, DA; Listerud, M (1994): Retinoic acid suppresses polyoma virus transformation by inhibiting transcription of the c-fos proto-oncogene. *Oncogene* 9 (12): 3557–3563.
- Terzi, MY; Izmirli, M; Gogebakan, B (2016): The cell fate: senescence or quiescence. *Molecular biology reports* 43 (11): 1213–1220.
- Tian, Y-C; Li, Y-J; Chen, H-C; Wu, H-H; Weng, C-H; Chen, Y-C; Lee, C-C; Chang, M-Y; Hsu, H-H; Yen, T-H; Hung, C-C; Yang, C-W (2014): Polyomavirus BK-encoded microRNA suppresses autoregulation of viral replication. *Biochemical and biophysical research communications* 447 (3): 543–549.

- Topalis, D; Andrei, G; Snoeck, R (2013): The large tumor antigen: a „Swiss Army knife“ protein possessing the functions required for the polyomavirus life cycle. *Antiviral research* 97 (2): 122–136.
- Toyoshima, H; Hunter, T (1994): p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78 (1): 67–74.
- Tylden, GD; Hirsch, HH; Rinaldo, CH (2015): Brincidofovir (CMX001) inhibits BK polyomavirus replication in primary human urothelial cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 59 (6): 3306–3316.
- Uray, IP.; Shen, Q; Seo, H-S; Kim, H; Lamph, WW; Bissonnette, RP; Brown, PH (2009): Retinoid-induced Expression of IGFBP-6 Requires RAR β -dependent Permissive Cooperation of Retinoid Receptors and AP-1. *The Journal of biological chemistry* 284 (1): 345–353.
- Uray, IP; Dmitrovsky, E; Brown, PH (2016): Retinoids and rexinoids in cancer prevention: from laboratory to clinic. *Seminars in oncology* 43 (1): 49–64.
- Vaishampayan, U; Heilbrun, LK; Parchment, RE; Jain, V; Zwiebel, J; Boinpally, RR; LoRusso P; Hussain, M (2005): Phase II trial of fenretinide in advanced renal carcinoma. *Investigational new drugs* 23 (2): 179–185.
- Valle, M; Gruss, C; Halmer, L; Carazo, JM; Donate, LE (2000): Large T-antigen double hexamers imaged at the simian virus 40 origin of replication. *Molecular and cellular biology* 20 (1): 34–41.
- van Regenmortel, MHV (Hg.) (2000): Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses; seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. International Union of Microbiological Societies. San Diego: Acad. Press.
- Vargas, DA; Takahashi, S; Ronai, Z (2003): Mdm2: A regulator of cell growth and death. *Advances in cancer research* 89: 1–34.
- Vassilev, LT; Tovar, C; Chen, S; Knezevic, D; Zhao, X; Sun, H; Heimbrook, DC; Chen, L (2006): Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (28): 10660–10665.
- Wang, Z-Y; Chen, Z (2008): Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood* 111 (5): 2505–2515.
- Wessel, R; Schweizer, J; Stahl, H (1992): Simian virus 40 T-antigen DNA helicase is a hexamer which forms a binary complex during bidirectional unwinding from the viral origin of DNA replication. *Journal of virology* 66 (2): 804–815.
- Wilson, JG; Roth, CB; Warkany, J (1953): An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *The American journal of anatomy* 92 (2): 189–217.

- Wittstock, M; Benecke, R; Zettl, UK (2003): Therapy with intravenous immunoglobulins: complications and side-effects. *European neurology* 50 (3): 172–175.
- Wolf, AA; Jobling, MG; Wimer-Mackin, S; Ferguson-Maltzman, M; Madara, JL; Holmes, RK; Lencer, WI (1998): Ganglioside structure dictates signal transduction by cholera toxin and association with caveolae-like membrane domains in polarized epithelia. *The Journal of cell biology* 141 (4): 917–927.
- Wollebo, HS; Bellizzi, A; Cossari, DH; Safak, M; Khalili, K; White, MK (2015): Epigenetic regulation of polyomavirus JC involves acetylation of specific lysine residues in NF-kappaB p65. *Journal of neurovirology* 21 (6): 679–687.
- Wright, AJ; Gill, JS (2016): Strategies to prevent BK virus infection in kidney transplant recipients. *Current opinion in infectious diseases* 29 (4): 353–358.
- Wu, YJ; Parker, LM; Binder, NE; Beckett, MA; Sinard, JH; Griffiths, CT; Rheinwald, JG (1982): The mesothelial keratins: a new family of cytoskeletal proteins identified in cultured mesothelial cells and nonkeratinizing epithelia. *Cell* 31 (3 Pt 2): 693–703.
- Yang, RC; Wu, R (1979): BK virus DNA: complete nucleotide sequence of a human tumor virus. *Science* 206 (4417): 456–462.
- Yang, SI; Lickteig, RL; Estes, R; Rundell, K; Walter, G; Mumby, MC (1991): Control of protein phosphatase 2A by simian virus 40 small-t antigen. *Molecular and cellular biology* 11 (4): 1988–1995.
- Ye, L; Wang, X; Wang, S; Luo, G; Wang, Y; Liang, H; Ho, W (2008): Centrifugal enhancement of hepatitis C virus infection of human hepatocytes. *Journal of virological methods* 148 (1-2): 161–165.
- Yuan, ZF; Davis, A; Macdonald, K; Bailey, RR (1995): Use of acitretin for the skin complications in renal transplant recipients. *The New Zealand medical journal* 108 (1002): 255–256.
- Zaidman, NA; Panoskaltis-Mortari, A; O'Grady, SM (2016): Differentiation of human bronchial epithelial cells: role of hydrocortisone in development of ion transport pathways involved in mucociliary clearance. *American journal of physiology. Cell physiology* 311 (2): C225-36.
- Zerrahn, J; Knippschild, U; Winkler, T; Deppert, W (1993): Independent expression of the transforming amino-terminal domain of SV40 large I antigen from an alternatively spliced third SV40 early mRNA. *The EMBO journal* 12 (12): 4739–4746.
- Zhang, M; Zhu, L; Feng, Y; Yang, Y; Liu, L; Ran, Y (2008): Effects of acitretin on proliferative inhibition and RANTES production of HaCaT cells. *Archives of dermatological research* 300 (10): 575–581.
- Zheng, K; Kitazato, K; Wang, Y (2014): Viruses exploit the function of epidermal growth factor receptor. *Reviews in medical virology* 24 (4): 274–286.

9 Danksagung

Mein größter Dank geht an Frau Prof. Smola für die freundliche (Wieder-)Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe. Darüber hinaus möchte ich ihr natürlich auch für ihre Gesprächsbereitschaft, Betreuung und Unterstützung während der letzten Jahre danken. Ein weiterer großer Dank geht an Herrn Prof. Römer für die Erstellung des Erstgutachtens meiner Dissertation.

Weiterhin möchte ich allen derzeitigen und auch ehemaligen Mitarbeitern der AG Smola danken, die mich auf die eine oder andere Weise auf dem Weg zu dieser Dissertation begleitet haben. Sei es innerhalb oder außerhalb des Labors. Ein besonderer Dank geht an Dr. Marlies Sauter, auch wenn sie bedingt durch ihren verdienten Ruhestand nicht viel Zeit meiner Promotion miterlebt, mich aber bereits in meiner Bachelor- und Masterarbeit betreut hat. Vielen Dank auch an Dr. Stefan Lohse für seine Diskussionsbereitschaft und an Barbara Best dafür, dass sie ihre längjährige Laborerfahrung in unzähligen Situationen mit mir geteilt hat. Allen anderen Arbeitsgruppen des Instituts möchte ich dafür danken, dass sie zu einem tollen Arbeitsklima am Institut beigetragen haben, was ein nicht zu verachtender Faktor bei der Bewältigung der alltäglichen Laborarbeit darstellt. Erwähnt sei zudem noch das PCR-Team der Diagnostik, mit denen ich an manchen Tagen mehr Zeit als mit meiner Arbeitsgruppe verbracht habe.

Ein Dank geht ebenfalls an Dr. Martin Janssen von der Klinik für Urologie für die Bereitstellung von Nierengewebe, an Prof. Lehr und Katharina Götz von der Klinischen Pharmazie für die interessanten Diskussionen über die pharmakologischen Eigenschaften von Retinoiden und an Dr. Michael Laue und Lars Möller vom Robert Koch Institut in Berlin für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen meiner Zellen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die durch ihre Unterstützung dazu beigetragen haben, dass ich nicht den Mut verloren habe, wenn die Dinge nicht direkt so funktionierten, wie sie sollten. Besonders danken möchte ich in diesem Zusammenhang meinen Eltern Roman und Andrea, sowie Katharina. Vielen Dank an Katharina auch dafür, dass sie es während der letzten Jahre (vor allem während des Schreibens) immer wieder geschafft hat, mich an passender Stelle für kurze Zeit von allem abzulenken, um anschließend direkt wieder als mein persönlicher Motivationstrainer aufzutreten.