

Molekularbiologische Analysen zur Funktion des hnRN-Proteins E1B-AP5



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III - Biologie und
Vorklinische Medizin der Universität Regensburg

vorgelegt von
André Rusch aus Weiden
Mai 2003

Die vorliegende Arbeit wurde selbständig
und ohne unzulässige Hilfe angefertigt.

André Rusch

Promotionsgesuch eingereicht am: 21. Mai 2003

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Juli 2003

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Peter Hegemann und PD. Dr. Thomas Dobner

Prüfungsausschuss: Vorsitzender

Prof. Dr. Jürgen Heinze

1. Prüfer (Erstgutachten)

Prof Dr. Peter Hegemann

2. Prüfer (Zweitgutachten)

PD. Dr. Thomas Dobner

3. Prüfer

Prof. Dr. Dr. Hans-Robert Kalbitzer

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	1
1 ZUSAMMENFASSUNG	3
2 EINLEITUNG	6
2.1 ADENOVIREN	6
2.1.1 KLASSIFIKATION	6
2.1.2 STRUKTUR UND GENOMORGANISATION	7
2.1.3 PRODUKTIVER INFEKTIONSZYKLUS	8
2.1.4 ONKOGENES POTENZIAL HUMANER ADENOVIREN	9
2.1.5 MECHANISMEN ADENOVIRUS-VERMITTELTEN ONKOGENESE	11
2.2 DAS E1B-55 kDA-PROTEIN	14
2.2.1 ONKOGENES POTENZIAL DES E1B-55 kDA-PROTEINS	14
2.2.2 LYTISCHE FUNKTIONEN DES E1B-55 kDA-PROTEINS	16
2.3 DAS E1B-AP5-PROTEIN	18
2.3.1 E1B-AP5 ALS ZELLULÄRE INTERAKTIONSPARTNER VON E1B-55 kDA	18
2.3.2 BETEILIGUNG VON E1B-AP5 AM ZELLULÄREN mRNA-EXPORT	19
2.3.3 TRANSFORMATIONSSINHIBITION DURCH E1B-AP5	21
2.4 AUFGABENSTELLUNG	22
3 MATERIAL	23
3.1 ORGANISMEN UND VIREN	23
3.1.1 BAKTERIENSTÄMME	23
3.1.2 SÄUGERZELLEN	23
3.1.3 ADENOVIREN	23
3.2 NUKLEINSÄUREN	24
3.2.1 OLIGONUKLEOTIDE	24
3.2.2 VEKTOREN	25
3.2.3 REKOMBINANTE PLASMIDE	25
3.3 ENZYME, FEINCHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIAL	27

3.4	ANTIKÖRPER	27
3.4.1	PRIMÄRANTIKÖRPER	27
3.4.2	SEKUNDÄRANTIKÖRPER	27
3.4.2.1	Sekundärantikörper für Western Blot-Analysen	27
3.4.2.2	Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz-Analysen	28
3.5	GRÖßEN- UND MOLEKULARGEWICHTSSTANDARDS	28
3.6	KOMMERZIELLE SYSTEME	28
3.7	COMPUTERPROGRAMME UND DATENBANKEN	29
4	METHODEN	30
<hr/>		
4.1	BAKTERIEN	30
4.1.1	VERMEHRUNG UND AUFBEWAHRUNG VON <i>E. COLI</i>	30
4.1.1.1	Flüssigkulturen	30
4.1.1.2	Plattenkulturen	30
4.1.1.3	Glyzerinkulturen	30
4.1.2	TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i> DURCH ELEKTROPORATION	31
4.2	SÄUGERZELLEN	32
4.2.1	KULTURBEDINGUNGEN UND LAGERUNG	32
4.2.1.1	Kultivierung von etablierten Zelllinien	32
4.2.1.2	Gewinnung und Kultivierung primärer Rattennierenzellen	33
4.2.1.3	Lagerung von Säugerzellen	33
4.2.2	BESTIMMUNG DER ZELLZAHL	33
4.2.3	TRANSFEKTION VON SÄUGERZELLEN	34
4.2.3.1	Kalziumphosphat-Transfektion von Säugerzellen	34
4.2.3.2	Lipofektion von Säugerzellen	35
4.2.4	TRANSFORMATION PRIMÄRER ZELLEN	36
4.3	ADENOVIREN	36
4.4	DNA-TECHNIKEN	37
4.4.1	PRÄPARATION VON DNA	37
4.4.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	37
4.4.2	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNA	38
4.4.3	GELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON DNA	38
4.4.4	ISOLIERUNG VON DNA AUS AGAROSEGELEN	39
4.4.5	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	39
4.4.6	KLONIERUNG VON DNA	40
4.4.6.1	Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme	40
4.4.6.2	Ligation und Transformation	40

4.4.6.3	Identifikation rekombinanter Klone	41
4.4.7	DNA-SEQUENZIERUNG	41
4.5	RNA-TECHNIKEN	41
4.5.1	PRÄPARATION VON RNA AUS SÄUGERZELLEN	41
4.5.2	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON RNA	42
4.5.3	GELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON RNA	43
4.5.4	RT-PCR-ANALYSEN	44
4.5.5	BESTIMMUNG VON TRANSKRIPTIONSSTARTS	44
4.5.5.1	Reverse Transkription	45
4.5.5.2	Aufreinigung von cDNA	45
4.5.5.3	Homopolymere Verlängerung von cDNA	46
4.5.5.4	cDNA-Zweitstrang-Synthese	46
4.6	PROTEIN-TECHNIKEN	46
4.6.1	GESAMTZELLEXTRAKT AUS SÄUGERZELLEN	46
4.6.2	FRAKTIONIERTER ZELLAUFSCHLUSS VON SÄUGERZELLEN	47
4.6.3	EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN <i>E. COLI</i>	49
4.6.3.1	Expression	49
4.6.3.2	Zellaufschluss	49
4.6.3.3	Affinitätsreinigung	50
4.6.4	QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON PROTEINKONZENTRATIONEN	51
4.6.5	RADIOAKTIVE MARKIERUNG DURCH IN-VITRO-TRANSKRIPTION/TRANSLATION	51
4.6.6	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	51
4.6.7	FÄRBUNG VON POLYACRYLAMIDGELEN	53
4.6.8	<i>WESTERN BLOT</i>	53
4.6.8.1	Proteintransfer auf Nitrozellulose	53
4.6.8.2	Bindung der Antikörper	53
4.6.8.3	Chemilumineszenz	54
4.6.9	<i>GST-PULLDOWN</i>	54
4.7	IMMUNFLUORESCENZ-ANALYSEN	55
4.7.1	DIREKTE FIXIERUNG MIT METHANOL	55
4.7.2	IN-SITU-PRÄPARATION VON NUKLEÄRER MATRIX UND CHROMATIN	55
4.7.3	IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS	56
4.8	LUZIFERASE-VERSUCH	56
5	ERGEBNISSE	58
<hr/>		
5.1	TRANSKRIPTIONSREGULATORISCHES POTENZIAL VON E1B-AP5	58
5.1.1	REGULATION BASALER PROMOTORAKTIVITÄT DURCH E1B-AP5	58

5.1.1.1	Luziferase-Versuche zur Regulation basaler Promotoraktivität durch E1B-AP5	58
5.1.1.2	Identifizierung der repressorischen Domäne des E1B-AP5-Proteins	60
5.1.2	MODULATION GLUCOCORTICOID-REGULIERTER PROMOTORAKTIVITÄT DURCH E1B-AP5	62
5.1.2.1	Einfluss von E1B-AP5 auf Glucocorticoid-vermittelte Transkription	62
5.1.2.2	Mutationsanalyse des regulatorischen Potenzials von E1B-AP5 auf GR-vermittelte Transkription	64
5.1.3	IDENTIFIZIERUNG VON BRD7 ALS E1B-AP5-ASSOZIIERTES PROTEIN	65
5.1.3.1	Herstellung eines GST-BRD7-Fusionsproteins	67
5.1.3.2	Herstellung von E1B-AP5-Deletionsmutanten	67
5.1.3.3	In-vitro-Wechselwirkung von E1B-AP5 mit GST-BRD7	69
5.1.3.4	In-vitro-Wechselwirkung von BRD7 mit GST-E1B-AP5	70
5.1.4	IN-VITRO-UNTERSUCHUNGEN ZUR WECHSELWIRKUNG DES BRD7-PROTEINS MIT HISTONEN	72
5.1.4.1	Einfluss von E1B-AP5 auf die BRD7-Histon-Wechselwirkung	73
5.1.5	BRD7 ALS KOFAKTOR DER E1B-AP5-VERMITTELTEN TRANSKRIPTIONSREGULATION	74
5.1.6	IN-VITRO-UNTERSUCHUNGEN ZUR WECHSELWIRKUNG VON E1B-AP5 MIT P300	77
5.2	GENOMISCHE ORGANISATION DES E1B-AP5-GENS	80
5.2.1	CHROMOSOMALE LOKALISATION UND EXON-INTRON-STRUKTUR DES E1B-AP5-GENS	80
5.2.2	PROMOTORSTRUKTUR DER E1B-AP5-TRANSKRIPTIONSEINHEIT	81
5.2.3	BESTIMMUNG DES TRANSKRIPTIONSSTARTS VON E1B-AP5	82
5.2.4	NACHWEIS ALTERNATIV GESPLEIßTER TRANSKRIPTTE VON E1B-AP5	87
5.2.5	STRUKTUR DES ALTERNATIVEN E1B-AP5-PROMOTORS P1A	91
5.3	ANALYSEN ZUR FUNKTION DER ISOFORM E1B-AP5-A	92
5.3.1	MODULATION DER TRANSKRIPTION DURCH E1B-AP5-A	92
5.3.2	EINFLUSS VON E1B-AP5-A AUF DIE TRANSFORMATION PRIMÄRER NAGETIERZELLEN	95
5.3.3	VERRINGERUNG DES ZELLWACHSTUMS DURCH E1B-AP5	97
5.3.4	WESTERN BLOT-ANALYSEN ZUM NACHWEIS DER ISOFORM E1B-AP5-A	99
5.4	UNTERSUCHUNGEN ZUR INTRANUKLEÄREN LOKALISATION VON E1B-AP5	101
5.4.1	FRAKTIONIERTER ZELLAUFSCHLUSS ZUR UNTERSUCHUNG DER INTRANUKLEÄREN LOKALISATION VON E1B-AP5	102
5.4.2	IN-SITU-UNTERSUCHUNGEN ZUR INTRANUKLEÄREN LOKALISATION VON E1B-AP5	103
5.4.3	MUTATIONSANALYSE DER INTRANUKLEÄREN LOKALISATION VON E1B-AP5	105
5.4.4	INTRANUKLEÄRE UMSTRUKTURIERUNG VON E1B-AP5 IM VERLAUF DES LYTISCHEN INFEKTIONSZYKLUS VON ADENOVIRUS SEROTYP 5	109
6	DISKUSSION	112
6.1	E1B-AP5 ALS KOFAKTOR DER MRNA-SYNTHESE	112
6.1.1	BETEILIGUNG VON E1B-AP5 AN DEN INITIALEN VORGÄNGEN DER TRANSKRIPTION	113

6.1.2	EINFLUSS VON E1B-AP5 AUF DIE GLUCOCORTICOID-VERMITTELTE TRANSKRIPTIONS-REGULATION	115
6.1.3	BRD7 EIN ZELLULÄRER INTERAKTIONSPARTNER VON E1B-AP5	117
6.2	ORGANISATION DES E1B-AP5-GENLOKUS	119
6.3	UNTERSCHIEDLICHE FUNKTIONEN DER E1B-AP5-ISOFORMEN	120
6.3.1	KONTROLLE DER ZELLZYKLUSPROGRESSION DURCH E1B-AP5	121
6.3.2	BETEILIGUNG VON E1B-AP5-A AM NUKLEÄREN mRNA-EXPORT	123
6.4	MODELLVORSTELLUNG ZUR FUNKTION DER E1B-AP5-PROTEINISOFORMEN	125
7	LITERATURVERZEICHNIS	129
<hr/>		
	VERÖFFENTLICHUNGEN	143
<hr/>		
	DANKSAGUNG	144
<hr/>		

ABKÜRZUNGEN

AS	Aminosäurerest
Abb.	Abbildung
Ad5	Adenovirus Serotyp 5
APS	Ammoniumpersulfat
BES	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
bid	bidest
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CTD	carboxyterminale Domäne
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	1, 4-Dithio-DL-threitol
E1, 2, 3, 4	frühe Region 1, 2, 3, 4 (<i>early region 1, 2, 3, 4</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylen-bis-(oxyethylennitrilo)-tetraacetat
EtOH _{75 %} , 70 %	Ethanol/Wassergemisch mit 75 %/70% Alkoholanteil
EtOH _{Abs}	Ethanol reinst
ffu	<i>fluorescence forming units</i>
FITC	Fluorescein isothiocyanat
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
GTF	Generelle/r Transkriptionsfaktor/en
h	Stunde
HA	Influenzavirus Hämagglutinin-Epitop
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
hnRNP	heterogene nukleäre Ribonukleoproteine
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
kB	Kilobasen
kBp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton

LB	Luria-Bertani Medium (<i>L-Broth Medium</i>)
min	Minute
moi	<i>multiplicity of infection</i>
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NTR	Nicht translatierte Region
orf	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PBS	Phosphat gepufferte Saline (<i>phosphate buffered saline</i>)
PIPES	Piperazin-1, 4-bis(2-ethansulfonsäure)
RLN	<i>RNA lysis buffer nuclear</i>
RLT	<i>RNA lysis buffer total</i>
S	Svedberg
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Tab.	Tabelle
TBE	Tris gepufferte Saline (<i>tris buffered saline</i>)
TdT	Terminale Desoxynukleotid Transferase
TEMED	N, N ,N' ,N' ,-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Spezifische Aktivität
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumeneinheit pro Gesamtvolumen (<i>volume per volume</i>)
w/v	Gewichtseinheit pro Gesamtvolumen (<i>weight per volume</i>)
wt	Wildtyp

1 ZUSAMMENFASSUNG

Das 55 kDa-Genprodukt der frühen Region 1B (E1B-55 kDa) von Adenovirus Typ 5 (Ad5) ist ein multifunktionelles Phosphoprotein, das eine Schlüsselfunktion im produktiven Infektionszyklus humaner Adenoviren einnimmt. In lytisch infizierten Zellen steuert E1B-55 kDa die virale Replikation durch die gezielte Nutzung bzw. Inaktivierung zellulärer Faktoren, die eine zentrale Rolle in der Regulation der Transkription, RNA-Prozessierung, Translation und Proteinstabilität spielen. In diesem Zusammenhang wurde in der Arbeitsgruppe ein zellulärer Interaktionspartner von E1B-55 kDa identifiziert (E1B-AP5), der erstmals den posttranskriptionellen Funktionen des viralen Proteins zugeordnet werden kann. Das E1B-AP5-Protein gehört zur großen Familie der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine (hnRNP) und zeigt in bestimmten Bereichen der Primärsequenz große Übereinstimmung zu dem nukleären Matrixprotein SAF-A, das bekanntermaßen die Vorgänge der Transkription und des mRNA-Metabolismus steuert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Funktion des E1B-AP5-Proteins sowie Analysen zur Regulation des E1B-AP5-Gens durchgeführt. Ziel dieser Arbeiten war es, weitere Hinweise über die Rolle des hnRN-Proteins in der Steuerung der zellulären Wachstumskontrolle zu erhalten. Durch transiente Promotor/Reporter-Analysen konnte gezeigt werden, dass E1B-AP5 die basale Aktivität verschiedener zellulärer und viraler Promotoren signifikant verringert. Die transkriptionshemmenden Eigenschaften von E1B-AP5 kartieren im aminoterminalen Bereich des Polypeptids, der Homologien zur Repressordomäne von SAF-A aufweist. Aufgrund dieser Übereinstimmung muss man annehmen, dass die intrinsische Repressoraktivität von E1B-AP5 über die Inhibition des generellen Transkriptionsfaktors TFIID vermittelt wird. Dagegen konnte die für SAF-A berichtete Inhibition hormonregulierter Transkription für E1B-AP5 nicht bestätigt werden. Interessanterweise wurde in diesem Zusammenhang mit dem BRD7-Protein ein Interaktionspartner von E1B-AP5 identifiziert, der wahrscheinlich die E1B-AP5-induzierte

Inhibition von TFIID moduliert. Da E1B-AP5 zudem über BRD7 einen trimeren Komplex zu acetylierten Histonproteinen ausbildet, muss man annehmen, dass die Chromatinstruktur aktivierter Gene die transkriptionsaktiven Funktionen von E1B-AP5 beeinflusst. Im Ganzen weisen diese Untersuchungen darauf hin, dass E1B-AP5 nur partiell redundante Eigenschaften zu SAF-A besitzt und wahrscheinlich eine Brückenfunktion bei der Verknüpfung von Transkription und RNA-Export einnimmt.

Diese Annahme wird durch den erstmaligen Nachweis eines alternativ prozessierten E1B-AP5-Transkripts (E1B-AP5-A) unterstützt, das für eine aminoterminal verkürzte Isoform des E1B-AP5-Polypeptids kodiert. Transiente Promotor/Reporter-Analysen mit E1B-AP5 und E1B-AP5-A zeigen, dass die verkürzte Isoform A nicht an den initialen Vorgängen der Transkriptionsregulation beteiligt ist. Vielmehr sprechen die erzielten Ergebnisse für eine Mitwirkung am nukleären Export viraler und zellulärer mRNA. In Übereinstimmung dazu stehen die Ergebnisse aus biochemischen Analysen und Immunfluoreszenz-Studien, die zeigen, dass die für E1B-AP5 spezifische SAP-Domäne die Verteilung des Vollängenproteins in die Matrix- und Chromatin-Subkompartimente des Zellkerns vermittelt, während die Isoform A eine nukleoplasmatische Verteilung aufweist sowie die Beobachtung, dass die nukleäre Verteilung von E1B-AP5 im Verlauf des produktiven Infektionszyklus von Ad5 dramatisch verändert wird. Somit könnte die duale Funktion von E1B-AP5 in den Vorgängen der Transkription und des mRNA-Transports durch zwei Isoformen vermittelt werden, die durch alternatives Spleißen gebildet werden. Diesem Modell zur Folge würde E1B-AP5 den Prozess der Transkription modulieren während E1B-AP5-A den Export gebildeter prä-mRNA reguliert. Dabei ist noch unklar, ob diese Vorgänge in virusinfizierten Zellen durch E1B-55 kDa verändert werden und welche Funktion beide Isoformen in der Regulation der zellulären Wachstums-kontrollmechanismen ausüben. Die Tatsache, dass E1B-AP5, nicht aber E1B-AP5-A die vollständige Transformation primärer Zellen supprimiert deutet auf eine Beteiligung von E1B-AP5 an der Zellzykluskontrolle hin. E1B-AP5 ist somit das erste Beispiel eines hnRN-Proteins, das über die Regulation der Zellzyklusprogression tumorsupprimierende Eigenschaften besitzt. Durch weiterführende Analysen zur

Funktion von E1B-AP5 und E1B-AP-A sollte es daher möglich sein diese Prozesse im Detail zu untersuchen und aufzuklären, in welchem Umfang die wachstumshemmenden Eigenschaften von E1B-AP5 durch das virale E1B-55 kDa-Protein in virusinfizierten und transformierten Zellen moduliert werden.

2 EINLEITUNG

2.1 Adenoviren

2.1.1 Klassifikation

Zu Beginn der fünfziger Jahre wurden Adenoviren erstmals aus adenoidem Gewebe und Rachensekreten respiratorisch erkrankter Personen isoliert (Rowe *et al.*, 1953; Hilleman und Werner, 1954). Die ersten Virusisolate wurden als *adenoid degeneration* (AD), *respiratory illness* (RI), *adenoidal-pharyngeal-conjunctival* (APC) oder *acute respiratory disease* (ARD) bezeichnet, wurden aber aufgrund gemeinsamer Merkmale und Eigenschaften (Huebner *et al.*, 1954) später zur Gruppe der Adenoviren zusammengefasst (Enders *et al.*, 1956). Aufgrund ihres Wirtsspektrums wird die Familie der *Adenoviridae*, die derzeit über 100 verschiedene, serologisch unterscheidbare Virustypen umfasst, wiederum in vier Gattungen unterteilt: Aviadenoviren der Vögel, Atadenoviren der Reptilien, Siadenoviren der Amphibien und Mastadenoviren, zu denen die Adenoviren der Säuger, einschließlich der bis heute bekannten 50 verschiedenen humanen Serotypen gehören (zur Übersicht: Horwitz, 1996; *International Committee on Taxonomy of Viruses*). Außerdem wurde die Einführung einer fünften Gattung, die Ichtadenoviren der Fische, vorgeschlagen (Benko *et al.*, 2002). Basierend auf dem onkogenen Potenzial im immunkompetenten Versuchstier und einer Reihe weiterer Merkmale (Hämagglutination, GC-Gehalt und Sequenzhomologien des viralen Genoms) werden humane Adenoviren in sechs Untergruppen (A bis F) eingeteilt (zur Übersicht: Graham, 1984; Shenk, 1996; Modrow und Falke, 1997). Sie verursachen sowohl lytische als auch persistierende Infektionen und sind mit einer Vielzahl klinischer Symptome assoziiert (zur Übersicht: Horwitz, 1996). Die Krankheitsbilder umfassen dabei okuläre, respiratorische und gastroenterale Erkrankungen, Zystitis, darüber hinaus persistierende Harnwegsinfektionen, Hepatitis und Meningoenzephalitis. In seltenen Fällen kann bei immunsupprimierten Personen eine Infektion mit Adenoviren zum Tode führen.

2.1.2 Struktur und Genomorganisation

Adenoviren bestehen aus einem 80 – 100 nm großen ikosaedrischen Proteinkapsid und enthalten ein doppelsträngiges, lineares DNA-Genom mit einer Länge von 34 – 44 kBp (zur Übersicht: Shenk, 1996). Charakteristisch für Adenovirus-Kapside sind 12 antennenartige Fortsätze (*spikes*) mit einer globulären Struktur am Ende (*knob*), die an den Ecken des Ikosaeders hervorragen und die Adsorption des Virus an den Rezeptor der Wirtszelle vermitteln (Abb. 1; Bergelson *et al.*, 1997).

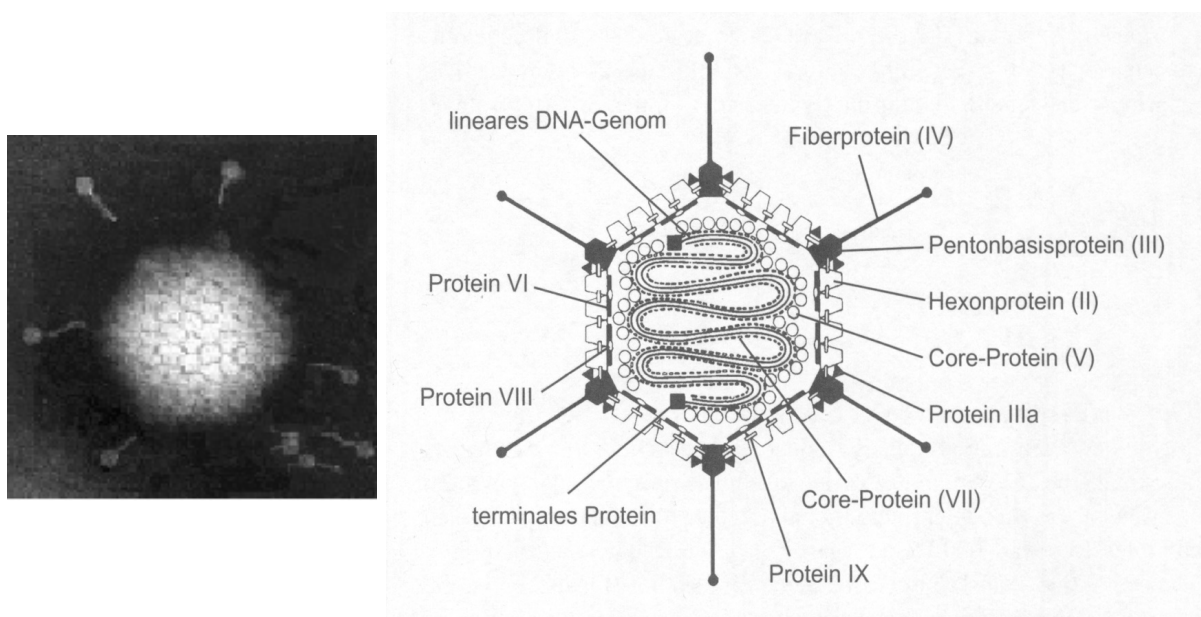


Abb. 1 Schematische Darstellung eines Adenovirus

Links ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Adenovirus-Partikels dargestellt. Gut zu erkennen ist das ikosaedrische Kapsid mit den aus Fiberprotein gebildeten *spikes*. Die rechte Darstellung zeigt einen schematischen Querschnitt durch das Virion (Modrow und Falke, 1997).

Zu den am ausführlichsten untersuchten Adenoviren gehören die nah verwandten Serotypen 2 und 5 (Ad2 und Ad5) der Subgruppe C. Die Genome von Ad2 und Ad5 enthalten neun Transkriptionseinheiten (Abb. 2), die für etwa 40 verschiedene regulatorische und strukturelle Proteine und zwei nicht translatierte RNAs (*virus-associated RNAs*, VA RNAs) kodieren. Im Vergleich zeigen alle humanen Adenoviren eine ähnliche Genomorganisation und exprimieren nahezu die gleichen Genprodukte (zur Übersicht: Shenk, 1996).

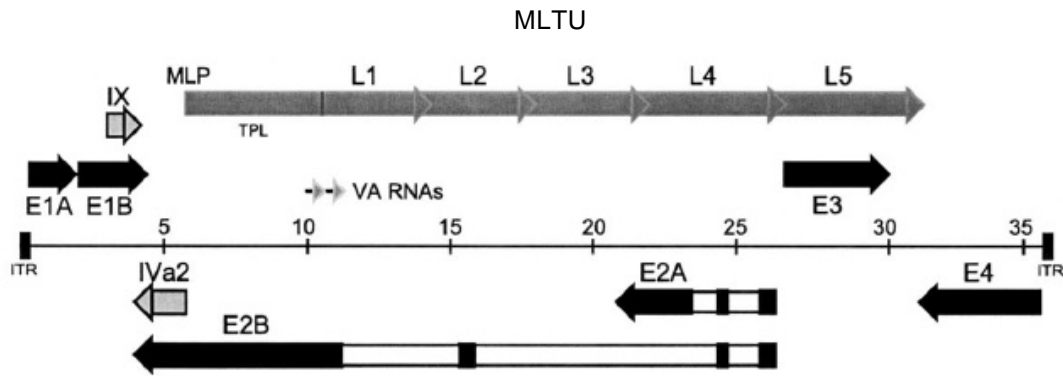


Abb. 2 Genomorganisation von Adenovirus Serotyp 5

Dargestellt ist die Lage der frühen Gene (E1A, E1B, E2A/B, E3, E4, IX und IVa2) und der späten Transkriptionseinheit (MLTU). Die Pfeilrichtung gibt die Transkriptionsrichtung auf den beiden kodierenden DNA-Strängen des viralen Genoms an. Die späten Gene (L1 bis L5) werden erst nach dem Einsetzen der viralen DNA-Replikation von einem gemeinsamen Promotor (MLP) aus transkribiert und kodieren hauptsächlich für Strukturproteine des Virions. Die frühen viralen Transkriptionseinheiten sind bereits vor Beginn der DNA-Synthese aktiv und besitzen regulatorische Funktionen in Bezug auf DNA-Replikation (E2), Modulation des Immunsystems (E3) sowie Transkription, RNA-Prozessierung und Zellzyklus-Kontrolle (E1A/E1B und E4). MLTU: *major late transcription unit*; MLP: *major late promoter*; TPL: *tripartite leader*; VA RNAs: *virus-associated RNAs*; ITR: *inverted terminal repeat*.

2.1.3 Produktiver Infektionszyklus

Adenoviren können sich teilende, aber auch differenzierte Zellen infizieren. Bevorzugte Zielzellen sind hauptsächlich postmitotisch ruhende Epithelzellen des Hals-, Nasen-, Rachenraumes, der Lunge und des Verdauungstraktes. Während der lytische Infektionszyklus im weiteren Verlauf den Zelltod bewirkt, ist das Virus im latenten Zustand fähig in der Zelle zu persistieren und einer Immunantwort zu entgehen. In Gewebekultur sind Adenoviren in der Lage eine Vielzahl unterschiedlichster Tumorzelllinien und primärer Zelltypen zu infizieren. Während sie in humanen Zellen einen produktiven (lytischen) Vermehrungszyklus durchlaufen, resultieren Infektionen von Zellen tierischen Ursprungs meist in einem abortiven Infektionsverlauf (zur Übersicht: Shenk, 1996).

Der produktive Infektionszyklus humaner Adenoviren verläuft in zwei Phasen, die durch das Einsetzen der viralen DNA-Replikation getrennt sind. Die frühe Phase der Infektion beginnt mit der Interaktion des Virions mit der Wirtszelle und ist gekennzeichnet durch die Expression von mehr als 20 regulatorischen Proteinen.

Diese werden von mRNA kodiert, die durch differenzielles Spleißen der fünf Vorläufer-mRNA-Moleküle der frühen Transkriptionseinheiten (*early regions*) E1A, E1B, E2, E3 und E4 gebildet werden. Die Hauptfunktion dieser meist multifunktionellen Proteine besteht darin, optimale Bedingungen für die virale DNA-Synthese und die Produktion viraler Strukturproteine in der späten Phase der Infektion zu schaffen. Dabei induzieren sie die Zellzyklusprogression (E1A und E1B), blockieren antivirale Schutzmechanismen der Wirtszelle (E1B), erschweren ein Erkennen durch das Immunsystem (E3) und vermitteln die virale DNA-Replikation (E2) (zur Übersicht: Burgert und Blusch, 2000; Horwitz, 2001). Mit dem Einsetzen der viralen DNA-Synthese beginnt die späte Phase des lytischen Infektionszyklus. Kennzeichnend ist die Expression der späten viralen Gene der *major late transcription unit* (MLTU), das gleichzeitige Abschalten der zellulären Proteinsynthese (*host shut-off*) und der Zusammenbau von Nachkommenviren. Die in der E4-Transkriptionseinheit zusätzlich kodierten Polypeptide zeichnen sich durch ihre zum Teil redundanten Funktionen aus, welche die Effizienz der lytischen Replikation erhöhen (zur Übersicht: Täuber und Dobner, 2001a). In Gewebekultur endet der produktive Vermehrungszyklus nach etwa 24 Stunden mit dem Absterben und der Lyse der Wirtszelle, wobei bis zu 10000 Viruspartikel pro Zelle freigesetzt werden (zur Übersicht: Shenk, 1996).

2.1.4 Onkogenes Potenzial humaner Adenoviren

Nach Angaben der WHO sind ein Fünftel der tödlichen Krebserkrankungen in den westlichen Industrienationen mit Virusinfektionen assoziiert. Ungeachtet dessen sind viele der als kanzerogen eingestuften Viren (Tab. 1) weit verbreitet. Dies unterstreicht, dass die Tumorentstehung ein mehrstufiger Prozess ist und die Beteiligung einer Reihe endo- und exogener Faktoren einschließt.

Obwohl die Entstehung von menschlichen Tumorerkrankungen durch humane Adenoviren nach heutigem Kenntnisstand unwahrscheinlich ist (Mackey *et al.*, 1976; Mackey *et al.*, 1979; Wold *et al.*, 1979; Chauvin *et al.*, 1990), waren sie die ersten humanpathogenen Viren für die kanzerogene Eigenschaften im Tiermodell

Tab. 1 Kanzerogene Viren des Menschen

VIREN	KREBSART	ZIELZELLEN	VIRALE ONKOPROTEINE
EBV	Nasopharynxkarzinom	Epithelzellen	LMP-1
	Burkitt Lymphom	B-Zellen	BZLF-1
	Hodgkin Lymphom	B-Zellen	LMP-1
HBV	Primäres Leberzellkarzinom	Leberzellen	HBx
HCV	Primäres Leberzellkarzinom	Leberzellen	unbekannt
HHV8	Kaposi Sarkom	Spindelzellen	ORF72
HPV	Zervixkarzinom und andere Karzinome	Epithelzellen	E6 und E7
HTLV-1	Adulte T-Zell-Leukämie	T-Zellen	tax

EBV: Epstein-Barr-Virus; HBV: Hepatitis-B-Virus; HCV: Hepatitis-C-Virus; HHV8: Humanes Herpesvirus 8; HPV: Humanes Papillomvirus; HTLV-1: Humanes T-Zell-Leukämievirus Typ 1

nachgewiesen wurden (Trentin *et al.*, 1962). Abhängig von der Effizienz und Latenzzeit der Tumorinduktion wurden die verschiedenen humanen Serotypen als nicht onkogen, schwach onkogen und hochonkogen eingestuft (zur Übersicht: Modrow und Falke, 1997). So induzieren die hochonkogenen Adenoviren der Subgruppe A innerhalb weniger Monate in neugeborenen Hamstern und Ratten mit großer Häufigkeit Tumore, während die schwach onkogenen Vertreter der Subgruppe B nur unregelmäßig und nach langen Inkubationszeiten Tumore hervorrufen (zur Übersicht: Graham, 1984). Viren der Subgruppen C bis F werden als generell nicht onkogen eingestuft. Einzige Ausnahme bilden die Serotypen 9 und 10 der Subgruppe D, die in weiblichen Ratten östrogenabhängige Mammakarzinome verursachen (Ankerst *et al.*, 1974; Jonsson und Ankerst, 1977; Ankerst und Jonsson, 1989; Javier *et al.*, 1991).

Ungeachtet der Tumorinduktion im Tiermodell sind alle bisher getesteten humanen Adenoviren in der Lage primäre Nagetierzellen in Gewebekultur zu transformieren (zur Übersicht: Nevins und Vogt, 1996). Die damit einhergehenden morphologischen Veränderungen bewirken, dass die transformierten Zellen zu mehrschichtigen, dichten Zellhaufen (*Foci*) auswachsen und verschiedene phänotypische Merkmale onkogener Transformation aufweisen. Im Gegensatz dazu lassen sich humane Zellen in Kultur nur sehr ineffizient mit Adenoviren transformieren. Auch die Transformation mit nicht infektiösen, subgenomischen viralen DNA-Fragmenten ist

im Vergleich zu Nagerzellen außerordentlich verringert und bis heute konnten nur wenige, im Allgemeinen embryonale Zellen und Amniozyten erfolgreich mit Ad12- oder Ad5-DNA-Fragmenten transformiert werden (Graham *et al.*, 1977; Byrd *et al.*, 1982; Whittaker *et al.*, 1984; Gallimore *et al.*, 1986; van den Heuvel *et al.*, 1992; Fallaux *et al.*, 1996; Fallaux *et al.*, 1998; Schiedner *et al.*, 2000). Die molekularen Grundlagen der unterschiedlichen Transformations-Effizienz von humanen und Nagerzellen sind jedoch noch weitgehend unbekannt, obwohl einige Modelle bereits diskutiert wurden (Shenk, 1996; Hutton *et al.*, 2000).

2.1.5 Mechanismen Adenovirus-vermittelter Onkogenese

Das onkogene Potenzial humaner Adenoviren wird traditionell der E1-Region zugeschrieben, die am linken Ende des adenoviralen Genoms (Abb. 2) lokalisiert ist. In dieser Region liegen die Transkriptionseinheiten E1A und E1B, deren Genprodukte für die vollständige morphologische Transformation ausreichend sind (zur Übersicht: Bernardis, 1984; Graham, 1984; Shenk, 1996). Sie können in den meisten Adenovirus-induzierten Tumoren, Tumorzelllinien und transformierten Zellklonen nachgewiesen werden (zur Übersicht: Tooze, 1981; Graham, 1984). Für die Immortalisierung von Nagerzellen ist die Expression der E1A-Genprodukte ausreichend (Houweling *et al.*, 1980). Die E1A-Transkriptionseinheit kodiert für zwei nukleäre, multifunktionelle Phosphoproteine (E1A 12S und E1A 13S; Abb. 3), deren mRNAs durch alternatives Spleißen einer Vorläufer-mRNA gebildet werden. Durch Interaktion mit wachstumshemmenden und genregulatorischen zellulären Faktoren (zur Übersicht: Russell, 2000) sind beide E1A-Proteine in der Lage den proliferativen Zustand der Zellen zu beeinflussen. Die damit verbundene Aufhebung der Zellzyklusbarrieren führt zusammen mit anderen viralen oder zellulären Onkogenen letztendlich zur Immortalisierung und Transformation der Zellen. Dabei reicht die alleinige Expression des E1A 12S-Proteins aus, um Nagerzellen zu immortalisieren und eine partielle Transformation hervorzurufen. Die im E1A 13S-Protein zusätzlich vorhandene zentrale Domäne ist für die transformierenden Eigenschaften ohne Bedeutung (zur Übersicht: Berk, 1986; Flint und Shenk, 1989).

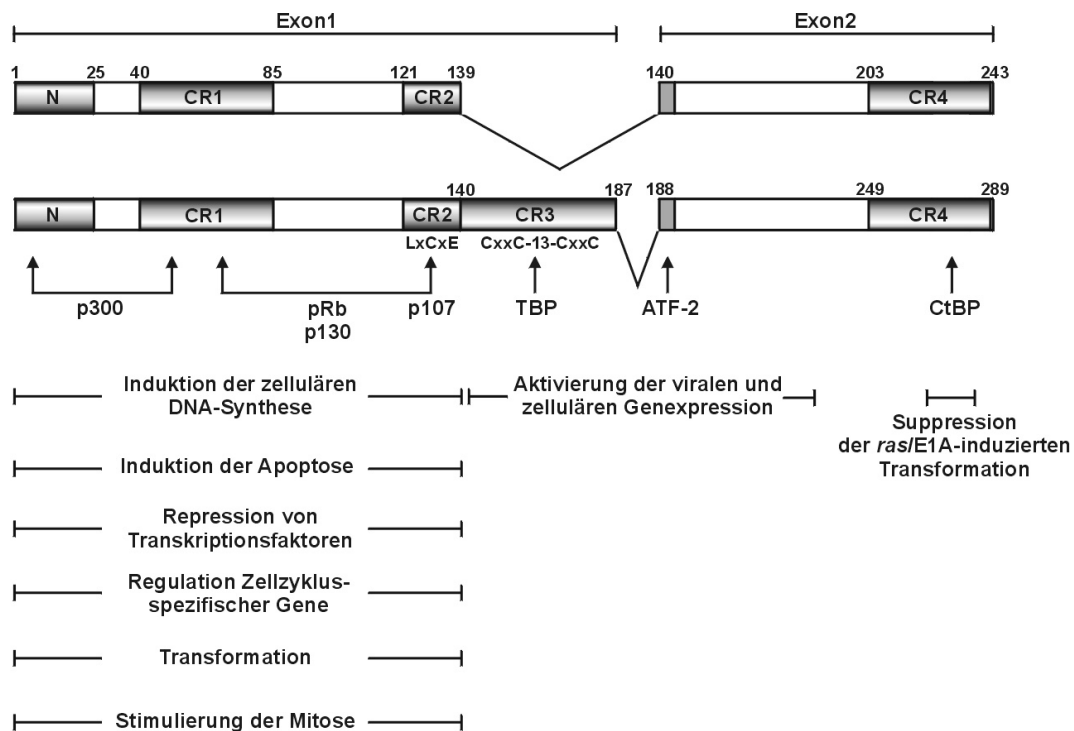


Abb. 3 Domänenstruktur der E1A-Genprodukte von Adenovirus Serotyp 5

Dargestellt sind die durch alternatives Spleißen gebildete E1A 12S- (oben) und 13S- (unten) mRNA sowie die funktionellen Domänen der abgeleiteten Polypeptide. Im E1A 12S-Genprodukt fehlt die im E1A 13S-Protein enthaltene CR3-Domäne. Die Zahlen oberhalb der schematischen Übersicht geben die Position in der abgeleiteten Aminosäuresequenz an (nach Avvakumov *et al.*, 2002). Außerdem sind zelluläre Interaktionspartner sowie Funktionen der einzelnen Domänen angegeben. N: aminoterminale konservierte Region; CR1 – CR4 : *conserved region* 1 – 4.

Zusätzlich zur Fähigkeit Immortalisierung und Transformation zu induzieren, sind beide E1A-Genprodukte in der Lage den programmierten Zelltod (Apoptose) einzuleiten. Dabei spielt die Akkumulation und Aktivierung des zellulären Tumorsuppressors p53 eine zentrale Rolle (zur Übersicht: White, 1995; Chinnadurai, 1998; White, 1998). Darüber hinaus ist E1A auch in der Lage p53-unabhängige Apoptosewege zu aktivieren (Teodoro *et al.*, 1995; Marcellus *et al.*, 1996).

Zur vollständigen morphologischen Transformation primärer Zellen sind zusätzlich die E1B-Genprodukte notwendig. Die E1B-Transkriptionseinheit kodiert für zwei Onkoproteine, E1B-55 kDa und E1B-19 kDa. Beide Genprodukte führen unabhängig voneinander in Kooperation mit E1A zur vollständigen Transformation primärer Nagerzellen, wobei die Effekte additiv wirken (Gallimore *et al.*, 1985; McLorie *et al.*, 1991). Wichtig hierfür ist die Fähigkeit beider E1B-Proteine, auf unterschiedlichen Wegen den E1A-induzierten Zelltod zu blockieren (zur Übersicht: Chinnadurai, 1998; White, 1998). Das E1B-19 kDa-Protein zeigt funktionelle Ähnlichkeiten zum

Tab. 2 Die in der E4 -Region kodierten Proteine (aus Täuber und Dobner, 2001a)

E4 PROTEIN¹	AS	MW	SUBZELLULÄRE LOKALISATION	INTERAKTIONSPARTNER
E4 ORF1	125	14 kDa	zytoplasmatisch	DLG, MUPP1, MAGI-1
E4 ORF2	136	14 kDa	zytoplasmatisch	unbekannt
E4 ORF3	116	11 kDa	nukleär	DNA PK, E1B-55 kDa
E4 ORF3/4	61	7 kDa	unbekannt	unbekannt
E4 ORF4	114	14 kDa	zytoplasmatisch/nukleär	PP2A, SF2/ASF, SRp30c, Src-Kinasen
E4 ORF6	294	34 kDa	nukleär	p53, p73, DNA PK, E1B-55 kDa
E4 ORF6/7	150	17 kDa	nukleär	E2F-1/DP-1

¹ E4 ORF1 aus Ad9, E4 ORF2 bis 6/7 aus Ad5

zellulären Proto-Onkogen Bcl-2 und interagiert mit den Apoptoseregulatoren Bax und CED4. Darüber hinaus kann E1B-19 kDa über einen noch unbekanntem Mechanismus die p53-induzierte, über den Carboxyterminus vermittelte Transrepression aufheben, obwohl keine direkte Interaktion beider Proteine gefunden wurde.

Zusätzlich zu den Genprodukten der E1-Region haben die Proteine der E4-Transkriptionseinheit (Tab. 2), insbesondere die E4 *open reading frame* (ORF) 3- und E4 ORF6-Polypeptide zum Teil redundante und zum Teil zusätzliche Funktionen, die zur Transformation primärer Zellen beitragen (zur Übersicht: Täuber und Dobner, 2001a; Täuber und Dobner, 2001b).

Darüber hinaus können zusätzliche genetische (zum Beispiel Insertionsmutagenese) und epigenetische (zum Beispiel Veränderung des Methylierungsmusters) Mechanismen zum onkogenen Potenzial humaner Adenoviren beitragen, die als Folge der Integration viraler Nukleinsäuren in das Wirtszellgenom auftreten (zur Übersicht: Dörfler, 1996).

2.2 Das E1B-55 kDa-Protein

2.2.1 Onkogenes Potenzial des E1B-55 kDa-Proteins

Die isolierte Expression der E1A-Genprodukte aktiviert unter anderem verschiedene Wege, die letztendlich zur Apoptose der Zelle führen würden. Durch die zusätzliche Expression des E1B-19 kDa-Proteins können einige der apoptotischen Effekte neutralisiert werden. Der E1A-induzierten Aktivierung und Stabilisierung des zellulären Tumorsuppressors p53 wirkt jedoch hauptsächlich das E1B-55 kDa-Protein entgegen.

Das E1B-55 kDa-Genprodukt ist ein multifunktionelles Phosphoprotein (Abb. 4), welches durch nukleäre Import- und Exportmechanismen zwischen Zytoplasma und Nukleus pendeln kann (Kratzer *et al.*, 2000). Darüber hinaus interagiert das E1B-55 kDa-Protein über zwei zentrale Domänen direkt mit dem Aminoterminus von p53 (Kao *et al.*, 1990; Yew *et al.*, 1990). Die Beobachtung, dass in E1-transformierten Zellen das Tumorsuppressorprotein durch das E1B-55 kDa-Genprodukt aus dem Zellkern in einen großen perinukleären Proteinkomplex relokalisiert wird (Zantema *et al.*, 1985), könnte zur funktionellen Inaktivierung von p53 beitragen. Außerdem ist das E1B-55 kDa-Protein in der Lage in Kooperation mit dem E4 ORF6-Genprodukt die Stabilität von p53 zu beeinflussen (Nevels *et al.*, 1997; Querido *et al.*, 1997; Nevels *et al.*, 1999; Querido *et al.*, 2001). Die zelluläre Gleichgewichtsmenge von p53 wird normalerweise durch das Mdm2 (*murine double minute*)-Protein bestimmt, indem es die Ubiquitylierung von p53 und den Export des Tumorsuppressors aus dem Zellkern vermittelt und dem proteasomalen Abbau zuführt. Dabei wird die Mdm2-vermittelte Destabilisierung von p53 durch Proteinmodifikationen, wie zum Beispiel Phosphorylierung und Sumoylierung beider Interaktionspartner reguliert (zur Übersicht: Alarcon-Vargas und Ronai, 2002). Untersuchungen in Adenovirus-infizierten und -transformierten Zellen zeigen, dass E1B-55 kDa und E4 ORF6 im Komplex mit Komponenten einer Ubiquitinligase vorliegen und die Ubiquitylierung von p53 vermitteln können. Der resultierende proteasomale Abbau von p53 könnte ebenfalls zur Blockade des E1A-induzierten p53-abhängigen Apoptoseweges beitragen (Querido *et al.*, 2001). Im Gegensatz zur

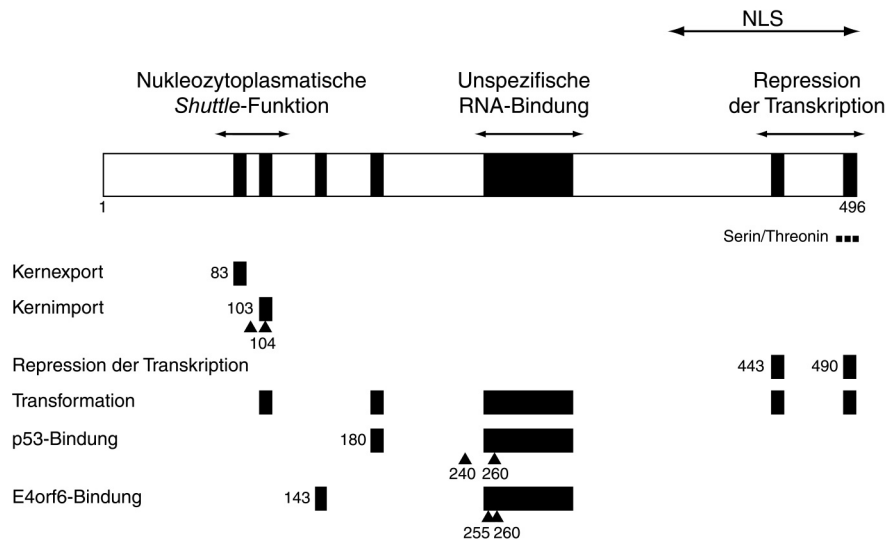


Abb. 4 Funktionelle Domänen des E1B-55 kDa-Proteins

Dargestellt ist die 496 Aminosäuren umfassende Primärstruktur von Ad5 E1B-55 kDa. Die durch In-vitro- und In-vivo-Experimente kartierten Domänen des E1B-55 kDa-Proteins und deren postulierten Funktionen sind angegeben. Die Ziffern bezeichnen Aminosäurepositionen. NLS: *nuclear localization signal*.

Mdm2-vermittelten Destabilisierung, bei der der nukleäre Export von p53 eine entscheidende Rolle spielt (Freedman und Levine, 1998), ist dies zumindest in Ad5-transformierten Rattenzellen keine Voraussetzung für den proteasomalen Abbau des Tumorsuppressors. Vielmehr scheint hier die Destabilisierung von p53 durch nukleäre Proteasomen, die in enger Verbindung zu *PML Oncogenic Domains* (PODs) stehen, vermittelt zu werden (Rubenwolf, 1999).

Neben der Sequestration von p53 in perinukleäre Proteinkomplexe durch das E1B-55 kDa-Genprodukt und der Destabilisierung des Tumorsuppressors durch den E1B-55 kDa-E4 ORF6-Komplex, ist das E1B-55 kDa-Protein in der Lage die transkriptionsaktivierenden Eigenschaften von p53 zu inhibieren (Yew und Berk, 1992; Yew *et al.*, 1994). Die Aktivierung des Tumorsuppressors schließt normalerweise eine erhöhte Affinität für die Promotorregion p53-regulierter Gene ein. Durch Wechselwirkungen der aminoterminalen Domäne von p53 mit Komponenten des Präinitiationskomplexes kommt es zur Transaktivierung der entsprechenden Promotoren (zur Übersicht: Prives und Hall, 1999). Für die E1B-55 kDa-induzierte Aufhebung dieser Transaktivierung könnte die Fähigkeit des adenoviralen Proteins von Bedeutung sein, die basale Aktivität des zellulären RNA-Polymerase II-Komplexes stark zu reprimieren (Yew *et al.*, 1994; Martin und Berk,

1998). Wahrscheinlich wird diese Verringerung der Transkription durch die Interaktion von E1B-55 kDa mit einem bisher noch nicht identifizierten zellulären Korepressor vermittelt (Martin und Berk, 1999). Die Rekrutierung dieses Faktors in den p53-E1B-55 kDa-Komplex könnte die beobachtete Repression p53-transaktivierter Gene in Adenovirus-infizierten und -transformierten Zellen erklären. Interessanterweise scheint das Wechselspiel zwischen dem zellulären Tumorsuppressor und dem viralen E1B-55 kDa-Genprodukt zusätzlich durch kovalente Modifikation mit SUMO-1 reguliert zu werden. Wie bereits erwähnt wird die Destabilisierung von p53 durch das zelluläre *mdm2*-Genprodukt vermittelt. Dieser Vorgang wird unter anderem durch Sumoylierung von Mdm2 reguliert (zur Übersicht: Alarcon-Vargas und Ronai, 2002). Im Gegensatz dazu scheint die Sumoylierung von E1B-55 kDa die Stabilität des p53-Proteins nicht zu beeinflussen. Vielmehr wird vermutlich durch die kovalente Verknüpfung des viralen Genprodukts mit SUMO-1 das transkriptionshemmende Potenzial von E1B-55 kDa auf die p53-vermittelte Transaktivierung reguliert. Interessanterweise scheint die Wechselwirkung mit dem zellulären Korepressor nicht beeinflusst zu werden. Die Sumoylierung von E1B-55 kDa ermöglicht wahrscheinlich darüber hinaus den effizienten nukleären Import des viralen Genprodukts und reguliert dessen subnukleäre Lokalisation, beides Effekte, die für das transformierende Potenzial von E1B-55 kDa zumindest in Nagetierzellen von entscheidender Bedeutung sein könnten (Endter *et al.*, 2001).

Insgesamt verfügt das E1B-55 kDa-Protein über vielfältige molekulare Strategien, der E1A-induzierten Aktivierung und Stabilisierung von p53 entgegenzuwirken und die resultierenden Apoptosemechanismen zu inhibieren.

2.2.2 Lytische Funktionen des E1B-55 kDa-Proteins

Das Abschalten der zellulären Proteinbiosynthese (*host shut-off*) ist eines der auffälligsten Ereignisse zu Beginn der späten Phase des adenoviralen Replikationszyklus (zur Übersicht: Dobner und Kzhyshkowska, 2001; 2.1.3). Frühe Untersuchungen zeigten, dass der effiziente Export später viraler mRNA aus dem

Zellkern in das Zytoplasma der Wirtszelle durch das E1B-55 kDa-Protein in Kooperation mit dem E4 ORF6-Genprodukt vermittelt wird (Babiss und Ginsberg, 1984; Pilder *et al.*, 1986; Leppard, 1993). Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass der Export nicht nur auf virale mRNA beschränkt ist, sondern auch zelluläre Transkripte mit einschliesst, deren transkriptionelle Aktivierung mit der späten adenoviralen Genexpression überlappt (Yang *et al.*, 1996). Dies bedeutet, dass der selektive Export von mRNA in der späten Phase nicht auf einem gemeinsamen Sequenzmotiv beruht, sondern mit dem Zeitpunkt der transkriptionellen Aktivierung korreliert. Aufgrund der Beobachtung, dass späte Transkripte oftmals nicht gespleißte Intronsequenzen enthalten, wurde angenommen, dass das E1B-55 kDa-Protein mit der nukleären Retention unvollständig gespleißter mRNA interferiert und so deren Export ermöglicht (Leppard, 1993). Der direkte Export von mRNA durch E1B-55 kDa scheint dabei eher unwahrscheinlich zu sein, obwohl ein unspezifisches RNA-Bindemotiv im E1B-55 kDa-Genprodukt identifiziert wurde (Horridge und Leppard, 1998). Vielmehr könnten die beobachteten Effekte darauf zurückzuführen sein, dass zelluläre Faktoren der nukleären Retention durch den E1B-55 kDa-E4 ORF6-Komplex inaktiviert und/oder weitere Proteine rekrutiert werden, welche die Dissoziation von mRNA aus Ribonukleoproteinkomplexen (RNP) und den anschließenden nukleären Export vermitteln.

Neben dem selektiven Export später Transkripte bewirkt das E1B-55 kDa-Protein die Inhibition der Translation zellulärer mRNA und ermöglicht die effiziente Translation später viraler Transkripte (Beltz und Flint, 1979). Vermutlich wird durch das E1B-55 kDa-Genprodukt die Dephosphorylierung des Faktors eIF-4E vermittelt (Harada und Berk, 1999), welches als Bestandteil des *cap-binding*-Komplexes essenziell für die Translationsinitiation zellulärer mRNA ist. Die Translation viraler mRNA der MLTU scheint aufgrund eines gemeinsamen Sequenzelements, dem *tripartite leader*, nicht auf die *cap*-abhängige Translationsinitiation angewiesen zu sein (Logan und Shenk, 1984; Berkner und Sharp, 1985; Dolph *et al.*, 1988; Dolph *et al.*, 1990).

2.3 Das E1B-AP5-Protein

2.3.1 E1B-AP5 als zellulärer Interaktionspartner von E1B-55 kDa

Die Beobachtung, dass die alleinige Expression von E1B-55 kDa für die effiziente Inhibition des zellulären mRNA-Exports zumindest in *Saccharomyces cerevisiae* ausreichend ist (Liang *et al.*, 1995), ließ den Schluss zu, dass von diesem viralen Protein potenziell notwendige zelluläre Faktoren rekrutiert werden. Basierend auf dieser Grundlage führten Gabler und Mitarbeiter Untersuchungen zur Identifizierung zellulärer Interaktionspartner des E1B-55 kDa-Genprodukts durch (Gabler *et al.*, 1998). Als Resultat konnte ein bis dahin unbekanntes Protein identifiziert werden, welches als E1B-55 kDa-assoziiertes Protein 5 (E1B-AP5) bezeichnet wurde.

Durch Sequenzvergleiche der vorhergesagten Primärstruktur von E1B-AP5 mit bekannten Proteinsequenzen wurden verschiedene Homologiedomänen (Abb. 5) gefunden (Gabler *et al.*, 1998). Besonders hervorzuheben sind dabei die Ähnlichkeiten zu SAF-A (*scaffold attachment factor A*, Synonym hnRNP-U; AS 198-598) und hnRNP-G (AS 600-856), die das Protein als neues potenzielles Mitglied der Familie der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine (hnRNP) ausweisen. Darüber hinaus lassen sich Homologien zum DEAD/H-Box Protein DDX1 (AS 227-385) sowie zum kleinen G-Protein Ran (AS 428-550) identifizieren. Expressions-Analysen

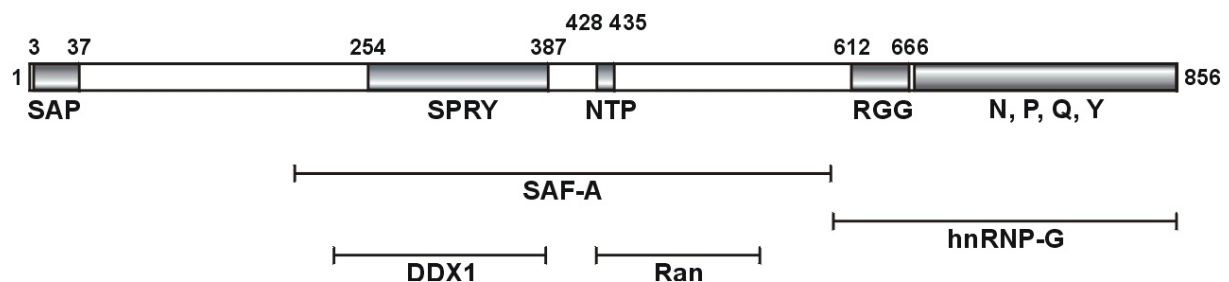


Abb. 5 Homologiedomänen von E1B-AP5

Dargestellt ist die 856 AS umfassende Primärstruktur von E1B-AP5. Über Datenbankanalysen gefundene, auffällige Sequenzmotive sind hervorgehoben (graue Boxen). Homologiebereiche zu den bekannten hnRN-Proteinen SAF-A und hnRNP-G, sowie zum G-Protein Ran und zum DEAD/H Box - Protein DDX1 sind gekennzeichnet. Die Ziffern geben die relative Lage der gefundenen Sequenzmotive an. SAP: *SAF-A/B, Acinus, PIAS putative DNA binding domain*; SPRY: *SPIa Ryanodine receptor domain*; NTP: *ATP/GTP binding loop (P-loop)*; RGG: Wiederholung des Aminosäuresequenzmotivs Arginin-Glycin-Glycin; N, P, Q, Y: Häufung der Aminosäuren Asparagin, Prolin, Glutamin und Tyrosin (nach Gabler *et al.*, 1998).

zeigten, dass in allen untersuchten Zelllinien sowohl das E1B-AP5-Transkript als auch das Protein nachzuweisen war (Gabler *et al.*, 1998). Die Analyse der subzellulären Verteilung von E1B-AP5 ergab, dass das Protein hauptsächlich im Zellkern lokalisiert ist. Die spezifische Interaktion zwischen E1B-55 kDa und E1B-AP5 wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt.

2.3.2 Beteiligung von E1B-AP5 am zellulären mRNA-Export

Die auffälligen Homologiebereiche zu den hnRN-Proteinen SAF-A und hnRNP-G führten zu der Schlussfolgerung, dass E1B-AP5 als potenzielles Mitglied dieser Proteinfamilie ebenfalls RNA-bindende Funktionen haben könnte. Dies wurde durch In-vitro-Bindungsstudien mit homopolymeren Ribonukleinsäuren bestätigt (Gabler *et al.*, 1998). Weitere Hinweise für die Beteiligung von E1B-AP5 am zellulären RNA-Metabolismus ergaben sich durch Studien, die den Einfluss des E1B-AP5-Proteins auf die E1B-55 kDa-vermittelte Inhibition des zellulären RNA-Exports im lytischen Infektionszyklus untersuchten. Die zugrunde liegende Überlegung war, dass die E1B-55 kDa-vermittelte Rekrutierung von E1B-AP5 als limitierenden Faktor für den spezifischen Export viraler mRNA-Spezies den zellulären *host shut-off* bewirkt. Eine Überexpression von E1B-AP5 sollte mit diesem Vorgang interferieren. Während in einer Kontrollzelllinie eine effiziente Inhibition des Exports der zellulären β -Aktin-mRNA beobachtet wurde, war dieser in einer E1B-AP5-überexprimierenden Zelllinie nicht beeinflusst. Gleichzeitig wurde ein verstärkter Export später viraler Transkripte beobachtet (Gabler *et al.*, 1998). Die Tatsache, dass die Menge zellulärer Proteine dennoch verringert wurde, bestätigte den spezifischen Einfluss des E1B-AP5-Polypeptids auf den zellulären RNA-Metabolismus. In weiteren Experimenten wurde die E1B-AP5-E1B-55 kDa-Wechselwirkung näher charakterisiert. Analysen von Ad5-Virusmutanten mit spezifischen Veränderungen der kodierenden Sequenz des E1B-55 kDa-Proteins ergaben, dass drei Regionen im E1B-55 kDa-Polypeptid die Wechselwirkung zu E1B-AP5 vermitteln (Abb. 6). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass durch eine Deletion des E4 ORF6-Leserahmens im adenoviralen Genom, die Menge des durch E1B-AP5 kopräzipitierten E1B-55 kDa-Genprodukts signifikant

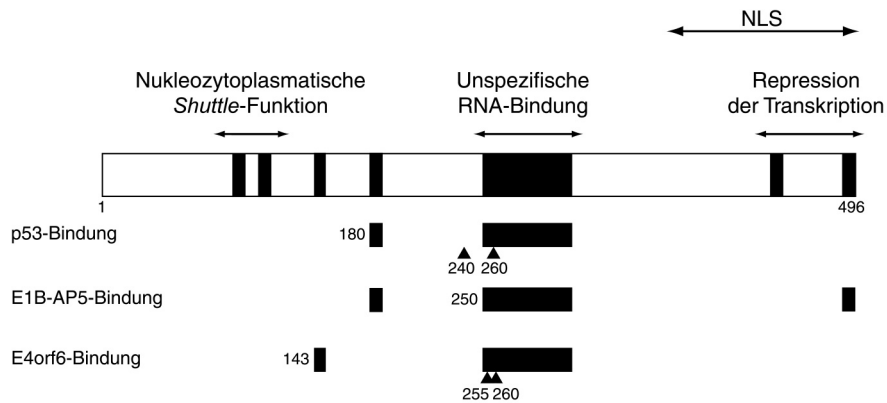


Abb. 6 E1B-AP5-Interaktionsdomänen von E1B-55 kDa

Dargestellt ist die schematische Übersicht der für die E1B-AP5-Wechselwirkung verantwortlichen E1B-55 kDa-Domänen. Auffallend ist die Überlappung im zentralen Bereich, die auf konkurrierende Interaktionen von p53, E4 ORF6 und E1B-AP5 hindeuten. Die Ziffern geben Aminosäurepositionen an. NLS: *nuclear localization signal*.

erhöht wurde. Dies weist auf eine Regulation der E1B-55 kDa-Wechselwirkung mit dem zellulären Protein durch das E4 ORF6-Polypeptid hin (Gabler *et al.*, 1998). Durch weitere In-vitro-Bindungsstudien wurde die E1B-55 kDa-Interaktionsdomäne des E1B-AP5-Polypeptids auf dessen carboxyterminalen Hälfte (AS 454-732) kartiert (Schütt, 2000).

Weitere Hinweise auf die Beteiligung von E1B-AP5 am Export zellulärer mRNA ergaben sich durch Untersuchungen des zellulären Proteins TAP, welches mit einer Vielzahl von Komponenten des Kernporenkomplexes wechselwirkt und den Export verschiedener mRNA-Spezies vermittelt (Bachi *et al.*, 2000). Während der Export viraler mRNA des *simian retrovirus type D*, die das *constitutive transport element* (CTE) enthalten, durch die direkte Wechselwirkung mit TAP vermittelt wird, wird zelluläre mRNA durch Koadaptoren in den Exportprozess eingeschleust. Dabei wurde E1B-AP5 als möglicher Kofaktor für den mRNA-Export identifiziert.

Die Interaktion von E1B-AP5 mit mRNA-Substraten wird möglicherweise durch posttranslationale Modifikation des E1B-AP5-Polypeptids moduliert. Die in der Primärstruktur von E1B-AP5 identifizierte Wiederholung der Aminosäuren Arginin-Glycin-Glycin (RGG; Abb. 5) ist ein Sequenzmotiv, welches an Protein-RNA- und Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt ist und durch asymmetrische Dimethylierung der Argininreste reguliert wird (Gary und Clarke, 1998). In-vivo-Untersuchungen ergaben, dass im E1B-AP5-Polypeptid spezifisch Argininreste der

RGG-Domäne methyliert werden (Kzhyshkowska *et al.*, 2001). In-vitro-Bindungsstudien lassen vermuten, dass diese Methylierung durch das HRMT1L1-Polypeptid vermittelt wird. Diese zelluläre Arginin-Methyltransferase verfügt als Besonderheit über eine *src homology 3* (SH3)-Domäne, welche für die spezifische Wechselwirkung mit E1B-AP5 *in vitro* und *in vivo* verantwortlich ist (Kzhyshkowska *et al.*, 2001).

2.3.3 Transformationsinhibition durch E1B-AP5

Die Beobachtung, dass die E1B-AP5-Interaktionsdomäne von E1B-55 kDa teilweise mit der p53-bindenden Region überlappt (Gabler *et al.*, 1998), legte die Vermutung nahe, dass das E1B-AP5-Polypeptid mit dem transformierenden Potenzial des adenoviralen Genprodukts interferiert. Zur Klärung dieser Frage wurde der Einfluss des E1B-AP5-Proteins auf die E1-vermittelte Transformation primärer Rattennierenzellen untersucht. Tatsächlich wurde durch zusätzliche Überexpression des E1B-AP5-Polypeptids eine starke Reduktion der *Focus*-Anzahl beobachtet (Gabler *et al.*, 1998). Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Hypothese, dass das E1B-AP5-Protein mit p53 um die E1B-55 kDa-Bindung konkurriert. Durch die Überexpression von E1B-AP5 würde somit das zelluläre Tumorsuppressorprotein aus dem E1B-55 kDa-Komplex verdrängt werden, was letztendlich zu Apoptose und damit zu einer Verringerung der *Focus*-Anzahl führt. Durch weitere Studien der E1B-AP5-Wirkung auf das Transformationspotenzial von E1A in Verbindung mit dem zellulären Onkogen *ras* konnte diese Hypothese jedoch nicht bestätigt werden. Auch in diesen Versuchen wurde durch die Überexpression von E1B-AP5 eine drastische Verringerung der *Focus*-Anzahl beobachtet (Schütt, 2000). Damit beruht wahrscheinlich die tumorsupprimierende Eigenschaft von E1B-AP5 nicht auf einer Freisetzung des p53-Proteins aus einem inaktivierenden Komplex, sondern deutet vielmehr auf einen noch nicht geklärten Mechanismus hin.

2.4 Aufgabenstellung

Die Familie der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine (hnRNP) wurde traditionell mit der Verpackung naszierender Prä-mRNA im Zuge der Transkription in Verbindung gebracht. Untersuchungen der letzten Jahre haben jedoch ergeben, dass einzelne Mitglieder der hnRN- Proteinfamilie über ein vielfältiges Funktionsspektrum verfügen und verschiedene Aspekte des zellulären RNA-Metabolismus beeinflussen. In diesem Zusammenhang konnte unsere Arbeitsgruppe erstmals zeigen, dass ein zelluläres Zielprotein des adenoviralen E1B-55 kDa-Polypeptids – E1B-AP5 – am RNA-Metabolismus beteiligt ist und im Verlauf der lytischen Replikation humaner Adenoviren in der Funktion moduliert wird. Darüber hinaus wurden erste Hinweise erhalten, dass das E1B-AP5-Protein mit der Transformation primärer Zellen interferiert.

Aufgrund der auffälligen Homologiebereiche des E1B-AP5-Polypeptids zum zellulären SAF-A-Protein (Synonym hnRNP-U) war es von Interesse, ob E1B-AP5 über ein vergleichbares Funktionsspektrum verfügt. Dazu sollte im Rahmen dieser Arbeit durch funktionelle Studien der Frage nachgegangen werden, welchen Einfluss das E1B-AP5-Polypeptid auf die initialen Vorgänge der Transkription ausübt und analog zu SAF-A eine Verringerung der basalen Aktivität verschiedener Promotoren verursacht. Weiterhin sollten durch Mutationsanalysen und In-vitro-Bindungsexperimente zelluläre Interaktionspartner des E1B-AP5-Proteins identifiziert werden, welche möglicherweise mit den transkriptionsregulatorischen Eigenschaften in Verbindung stehen. Schließlich sollte auf der Grundlage dieser Ergebnisse durch Transformationsversuche die Frage beantwortet werden, ob über die Wechselwirkung mit E1B-AP5 diese Faktoren auch an der Transformationssuppression primärer Zellen beteiligt sind.

3 MATERIAL

3.1 Organismen und Viren

3.1.1 Bakterienstämme

BEZEICHNUNG	EIGENSCHAFTEN
BL 21-CodonPlus-RIL	<i>F</i> <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻) <i>dcm</i> ⁺ <i>Tet</i> ^r <i>gal</i> <i>endA</i> <i>Hte</i> [<i>argU</i> <i>ileY</i> <i>leuW</i> <i>Cam</i> ^r] (Stratagene)
DH 10B	<i>F</i> <i>araD139</i> D (<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697 D <i>lacX74</i> <i>galU</i> <i>galK</i> <i>mcrA</i> D (<i>mrr</i> , <i>hsdR</i> , <i>mcrBC</i>) <i>rspL</i> <i>deoR</i> (F 80d <i>lacZDM15</i>) <i>endA1</i> <i>nup5</i> <i>recA1</i> (Bethesda Research Laboratories)
SURE	<i>e14</i> ⁻ (<i>mcrA</i> ⁻) D (<i>mcrCB</i> - <i>hsdSMR</i> - <i>mrr</i>)171 <i>endA1</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> <i>recB</i> <i>recJ</i> <i>sbcC</i> <i>umuC::Tn5</i> (<i>Kan</i> ^r) <i>uvrC</i> [<i>F'</i> <i>proAB</i> <i>lacI^qZDM15</i> <i>Tn10</i> (<i>Tet</i> ^r)] (Stratagene)

3.1.2 Säugerzellen

BEZEICHNUNG	EIGENSCHAFTEN
A549	Humane Lungenkarzinom-Zelllinie (Giard <i>et al.</i> , 1973)
BRK	Primäre Nierenzellen aus 5 - 6 Tage alten <i>Sprague-Dawley</i> -Ratten
H1299	Humane Lungenkarzinom-Zelllinie, p53-negativ (Mitsudomi <i>et al.</i> , 1992)
HeLa	Humane Zervixkarzinom-Zelllinie (Yee <i>et al.</i> , 1985)
MCF7	Humane Mammakarzinom-Zelllinie, Überexpression von <i>mdm2</i> (Soule <i>et al.</i> , 1973)

3.1.3 Adenoviren

BEZEICHNUNG	EIGENSCHAFTEN
H5 <i>dl309</i>	Adenovirus Typ 5-Derivat, Deletion der E3-Region (Jones und Shenk, 1979)

3.2 Nukleinsäuren

3.2.1 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion bezogen.

#1	BEZEICHNUNG	SEQUENZ	VERWENDUNG
1JKO	GST-BRD7forw	AAT TCC CGG GGG ACA TGG GCA AGA AG	Amplifikation
2JKO	E1B-AP5ΔBBS1A	GAT ATA GTT GCG TTT CTT ATT GGT ACC CAG GAT GTT GTA	Amplifikation
3JKO	E1B-AP5ΔBBS1B	TAC AAC ATC CTG GGT ACC AAT AAG AAA CGC AAC TAT ATC	Amplifikation
4JKO	E1B-AP5ΔBBS2A	GCG GCC TTC CTC GTT GTA ATT GGT ACC CAG GAT GTT GTA	Amplifikation
5JKO	E1B-AP5ΔBBS2B	TAC AAC ATC CTG GGT ACC AAT TAC AAC GAG GAA GGC CGC	Amplifikation
6JKO	E1B-AP5BBSforw	CGC TCG AGG TAC CAA TGC CAT CAT G	Amplifikation
7JKO	E1B-AP5BBSrev	CGC TCG AGC TAG TTG TCA AAG CGC TTT TCA G	Amplifikation
8JKO	BRD7forw	GCG GTA CCA CAT GGG CAA GAA GCA CAA G	Amplifikation
9JKO	BRD7ΔBD-A	GCT CTG CTT CAG GCT CTG TTG TTT GGC TAA AGA GCT TG	Amplifikation
10JKO	BRD7ΔBD-B	CAA GCT CTT TAG CCA AAC AAC AGA GCC TGA AGC AGA GC	Amplifikation
635	pcDNA3forw	ATG TCG TAA CAA CTC CGC	Amplifikation
636	pcDNA3rev	GGC ACC TTC CAG GGT CAA G	Amplifikation
693	BRD7rev	CGC TCG AGT CAA CTT CCA CCA GGT CCA C	Amplifikation
976	BRD7-D1forw	GCG CGG ATC CGG AAG ACT TCA GTC TGG A	Amplifikation
1007	RT-AP5-Var-1	GTT CTG ATA GTA CTG GTT C	RT-PCR
1009	RT-AP5-Var-3	GCG GAT CCA CAT GCC ATG GAC AAT ATT AC	RT-PCR
1011	RT-AP5-Var-5	GAA GTC GGA CGT GGG CGA G	RT-PCR
1015	RT-AP5-Var-7	GAC GAG GCA CGA GTG AG	RT-PCR
1083	AP5-Var-Seq	GGT GCT CCT TGC TTC ATC	Sequenzierung
1094	AP5-5'Race1	AGC AGC CAA TCA CAT CG	5' RACE
1095	AP5-5'Race2	AAG GCT CTT CGC CTA GCT G	5' RACE
1096	AP5-5'Race3	TTC ATC TCG AAG CAT ACA CG	5' RACE
1104	AUAP	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC	5' RACE
1105	dTAdap	GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T	5' RACE

1106	Oligo-dT ₍₁₇₎	TTT TTT TTT TTT TTT TT	RT-PCR
------	--------------------------	------------------------	--------

¹ Laufende Nummer in der Datenbank der Arbeitsgruppe

3.2.2 Vektoren

# ¹	BEZEICHNUNG	VERWENDUNG	REFERENZ
77	pGL2-basic	Luziferase-Assay	Promega
80	pGL2-control	Luziferase-Assay	Promega
101	pGEX 4T-1	Bakterielle Expression/Proteinaufreinigung	Pharmacia
136	pcDNA3	Transfektion, In-vitro-Transkription/Translation	Invitrogen
181	pRL-CMV	Luziferase-Assay	Promega

¹ Laufende Nummer in der Datenbank der Arbeitsgruppe

3.2.3 Rekombinante Plasmide

# ¹	BEZEICHNUNG	VEKTOR	FREMDGEN/EXPRESSION	REFERENZ
3AR	pHA-E1B-AP5-A	pcDNA3	E1B-AP5 Isoform A	diese Arbeit
1JKP	pHA-E1B-AP5BBS	pcDNA3	E1B-AP5, M1-R23G454-N611	diese Arbeit
2JKP	BRD7 Δ BD-2	pGEX-4T-1	BRD7, Δ AS 1-375	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
96	pCMV-E1A 12S	pCMV _{neo}	Ad5 E1A-12S	Bagchi <i>et al.</i> , 1990
144	Ej-ras		ras	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
248	pGL BL-Luc	pGL2-basic	HSV tk-Promotor	Nevels <i>et al.</i> , 1997
250	pGL C3G5-Luc	pGL2-basic	fos Minimalpromotor mit fünf vorgeschalteten GAL4-Bindedomänen	Nevels <i>et al.</i> , 1997
250	pGL C3G1-Luc	pGL2-basic	fos Minimalpromotor	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
256	pXP 162	pGL2-basic	H2a Promotor	Oswald <i>et al.</i> , 1996
401	pGL E1B-Luc	pGL2-basic	Ad5 E1B-Promotor	Parks <i>et al.</i> , 1988
502	pGL2-AP5P/E	pGL2-basic	E1B-AP5-Promotor	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
520	pGEX-E1B-AP5	pGEX-5X-1	E1B-AP5	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
608	pXC15	pML	Ad5 E1-Region	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
737	pE1A	pML	Ad5 E1A-12S und -13S	Stammsammlung der Arbeitsgruppe

869	pHA-E1B-AP5wt	pcDNA3	E1B-AP5	Kzhyshkowska <i>et al.</i> , 2001
887	pHA-E1B-AP5 Δ C	pcDNA3	E1B-AP5, Δ AS G454-Q856	Kzhyshkowska <i>et al.</i> , 2001
911	pHA-SAF-A	pcDNA3	SAF-A	G. Dreyfuss
965	pHA-E1B-AP5 Δ RRGG	pcDNA3	E1B-AP5, Δ AS R612-R685	Kzhyshkowska <i>et al.</i> , 2001
988	pHA-E1B-AP5 Δ PP	pcDNA3	E1B-AP5, Δ AS P696-S716	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1010	pcDNA3-E1B-55 kDa	pcDNA3	Ad5 E1B-55 kDa	Moore <i>et al.</i> , 1996
1033	pGEX-2T-p300A	pGEX-2T	p300 AS 1640-1845	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1034	pGEX-2T-p300C	pGEX-2T	p300 AS 1885-2112	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1035	pGEX-2T-p300D	pGEX-2T	p300 AS 2026-2219	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1036	pGEX-2T-p300E	pGEX-2T	p300 AS 2220-2324	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1037	pGEX-2T-p300F	pGEX-2T	p300 AS 2267-2412	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1046	pGEX-2T-p300B	pGEX-2T	p300 AS 1764-1967	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1146	6HisT-H2A	pET15b	H2A	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1147	6HisT-H2B	pET15b	H2B	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1148	6HisT-H3	pET15b	H3	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1149	6HisT-H4	pET15b	H4	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1181	pHA-E1B-AP5 Δ BBS1	pcDNA3	E1B-AP5, Δ AS N456-R497	diese Arbeit
1183	pHA-E1B-AP5 Δ BBS2	pcDNA3	E1B-AP5, Δ AS N456-Y594	diese Arbeit
1184	pSport-Brm	pSPORT1	BRD7	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1185	pFLAG-BRD7	pcDNA3	BRD7	diese Arbeit
1186	pFLAG-BRD7 Δ BD-1	pcDNA3	BRD7, Δ AS E129-I237	diese Arbeit
1191	MMTV-Luc	pGL2-basic	MMTV-Promotor	Pfizner <i>et al.</i> , 1998

¹ Laufende Nummer in der Datenbank der Arbeitsgruppe

3.3 Enzyme, Feinchemikalien und Verbrauchsmaterial

Wenn nicht anders angegeben wurden alle verwendeten Enzyme von den Firmen Invitrogen, New England Biolabs und Roche bezogen.

Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham erworben.

Alle Feinchemikalien wurden von den Firmen Sigma und Merck, Zellkulturmaterial von den Firmen Falcon, Gibco BRL und Pan, sonstiges Plastikmaterial von den Firmen Falcon, Sarstedt, Greiner und Eppendorf bezogen.

3.4 Antikörper

3.4.1 Primärantikörper

BEZEICHNUNG	EIGENSCHAFTEN
B6-8	Monoklonaler Antikörper gegen das E2A-72 kDa-Protein von Ad5 (Maus; Reich <i>et al.</i> , 1983)
α -E1B-AP5	Polyklonales Serum gegen das E1B-AP5-Protein (Kaninchen; Gabler <i>et al.</i> , 1998)
6C5	Monoklonaler Antikörper gegen das E1B-AP5-Protein (Ratte; Schütt, 2000)
4A11	Monoklonaler Antikörper gegen das E1B-AP5-Protein (Ratte; Schütt, 2000)
3F10	Monoklonaler Antikörper gegen das HA-Epitop (Ratte; Roche)

3.4.2 Sekundärantikörper

3.4.2.1 Sekundärantikörper für Western Blot-Analysen

BEZEICHNUNG	EIGENSCHAFTEN
HRP-Anti-Kaninchen IgG	Meerrettichperoxidase-gekoppelter Antikörper aus Esel (Amersham)
HRP-Anti-Ratte IgG	Meerrettichperoxidase-gekoppelter Antikörper aus Ziege (Amersham)

3.4.2.2 Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz-Analysen

BEZEICHNUNG	EIGENSCHAFTEN
FITC-Anti-Kaninchen IgG (H + L)	Fluorescein (FITC)- gekoppelter Antikörper aus Esel (Dianova)
FITC-Anti-Maus IgG (H + L)	Fluorescein (FITC)- gekoppelter Antikörper aus Esel (Dianova)
Texas Red-Anti-Ratte IgG (H + L)	Texas Red (TR)- gekoppelter Antikörper aus Esel (Dianova)

3.5 Größen- und Molekulargewichtsstandards

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Molekülen wurde die *1 kb DNA ladder* (Invitrogen) verwendet, für RNA-Moleküle der RNA Standard II (Roche).

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen wurde entweder der *Broad Range Marker* (BioRad) oder der *Precision Protein Standard* (BioRad) verwendet.

3.6 Kommerzielle Systeme

Folgende kommerzielle Systeme wurden verwendet:

BEZEICHNUNG	HERSTELLER
Prism Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Protein-Assay	BioRad
DeepBlue	EnerGene
SilverSurfer	EnerGene
5' RACE System Version 2.0	Invitrogen
SuperScript First-Strand Synthesis System	Invitrogen
Nucleobond AX Plasmid Midi und Maxi Kit	Macherey Nagel
NucleoSpin Extract Gelextraction Kit	Macherey Nagel
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega
TNT T7-coupled Reticulocyte Lysate System	Promega
RNeasy Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gelextraction Kit	Qiagen

3.7 Computerprogramme und Datenbanken

Diese Arbeit wurde mit MS Office 97 (Microsoft) erstellt. Die digitale Nachbearbeitung der Daten wurde mit Photoshop 5.0 (Adobe) und Photopaint 8.0 (Corel) durchgeführt. Die Abbildungen wurden mit Illustrator 8.0 (Adobe) und Corel Draw 8.0 (Corel) erstellt. Sequenzanalysen wurden mit dem Programmpaket BioEdit 5.0.9 (Hall, 1999), Homologie- und Motivsuchen auf Protein- und DNA-Ebene wurden mit Hilfe des BLAST-*servers* (www.ncbi.nlm.nih.gov) durchgeführt. Für Literatursuchen wurde die Medline-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) benutzt. Promotor-Analysen wurden mit dem *GenomatixSuite*-Softwarepaket (www.genomatix.de) durchgeführt. Das Literaturverzeichnis wurde mit dem Programm Endnote 3.0 (Niles Software) erstellt.

4 METHODEN

4.1 Bakterien

4.1.1 Vermehrung und Aufbewahrung von *E. coli*

4.1.1.1 Flüssigkulturen

Steriles LB-Medium wurde gegebenenfalls mit Ampicillin versetzt (100µg/ml), mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C in einem Inkubator geschüttelt (180 – 220 UpM; New Brunswick). Die Bakterienkonzentration wurde im Bedarfsfall fotometrisch (SmartSpec™ 3000, BioRad) bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) gegen das Medium bestimmt (1 OD₆₀₀= 8 × 10⁶ Zellen/ml).

4.1.1.2 Plattenkulturen

Bakterien wurden mit einer sterilen Impföse aus einer Flüssig- oder Glycerinkultur entnommen, auf eine Agarplatte zu Einzelkolonien ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Plattenkulturen wurden mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging) verschlossen und konnten mehrere Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden.

4.1.1.3 Glycerinkulturen

Eine Einzelkolonie wurde in 10 ml Flüssigmedium überimpft, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 – 1 bei 37 °C geschüttelt und anschließend abzentrifugiert (4000 UpM, 4 °C, 5 min; Rotixa 50RS, Hettich). Das Bakteriensediment wurde in 0,5 ml LB-Medium resuspendiert und in *CryoTubes™* (Nunc) mit 0,5 ml Glycerin versetzt. Diese Dauerkulturen sind bei –80 °C nahezu unbegrenzt haltbar.

LB-MEDIUM	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	5 g/l

4.1.2 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Zur Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen (Sharma und Schimke, 1996) wurde 1 l YENB-Medium mit 10 ml einer frischen Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,9 geschüttelt. Die Kultur wurde 5 min auf Eis gekühlt und anschließend abzentrifugiert (6000 UpM, 4 °C, 10 min; Centrikon T-124, Kontron Instruments). Der Überstand wurde verworfen und das Bakteriensediment zweimal in 100 ml eiskaltem H₂O_{bid} und einmal in 20 ml eiskaltem 10 %igem Glycerin gewaschen, mit erneuter Zentrifugation nach jedem Resuspensionsschritt. Die Bakterien wurden schließlich in 3 ml 10 %igem Glycerin aufgenommen, in Aliquots von je 50 µl aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei –80 °C.

YENB-MEDIUM	Bacto Yeast Extract	7,5 g/l
	Bacto Nutrient Broth	8 g/l

Für die Elektroporation von Ligationsansätzen (4.4.6.2) mussten diese zur Entsalzung zunächst gefällt werden. Hierfür wurde zum Ansatz 5 µg Lachssperma-DNA als *carrier*, 1/10 Vol. NaOAc (3 M) und 2¹/₂ Vol. EtOH_{abs} gegeben. Nach Zentrifugation (14000 UpM, 4 °C, 15 min; *Centrifuge* 5417R, Eppendorf) wurde das Sediment einmal mit EtOH_{75 %} gewaschen, 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich in 10 µl H₂O_{bid} aufgenommen. Die elektrokompenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 – 10 µl Plasmid-DNA vermischt und in eine gekühlte Elektroporationsküvette (1 mm Elektrodenabstand, BioRad) gegeben. Nach der Elektroporation (1,25 kV, 25 µF, 200 Ω; MicroPulser™, BioRad) wurde die Zellsuspension sofort mit vorgewärmten LB-Medium ausgespült und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf) 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (8000 UpM, 21 °C, 30 s; *Centrifuge* 5417R, Eppendorf) wurden die Bakterienpellets in 50 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Nährböden mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert.

4.2 Säugerzellen

4.2.1 Kulturbedingungen und Lagerung

4.2.1.1 Kultivierung von etablierten Zelllinien

Adhärente Zellen wurden als Einschichtkulturen in liegenden Polystyrol-Flaschen und -Schalen (Falcon) in *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM, Gibco BRL; Dulbecco und Freeman, 1959) vermehrt. Das Medium wurde mit 5 % fötalem Kälberserum (Pan) angereichert, wobei dort enthaltene Komplementfaktoren zuvor bei 56 °C für 30 min inaktiviert wurden. Zusätzlich wurde das Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung (Pan) versetzt. Die Zellen wurden in 7 %iger CO₂-Atmosphäre bei 37 °C in einem CO₂-Brutschrank (Heraeus) inkubiert und regelmäßig mit frischem Medium versorgt. Abhängig von der Zelldichte wurden die Zellen alle 3 – 5 Tage im Verhältnis 1 : 4 bis 1 : 10 subkultiviert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (Pan) von den Zellkulturgefäßen abgelöst. Nach Kompetition des Trypsins durch Zugabe von 3 – 5 ml Medium wurden die abgelösten Zellen in einem Polystyrol-Röhrchen (Greiner) abzentrifugiert (1500 UpM, 21 °C, 3 min; Rotixa 50RS, Hettich). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in Medium resuspendiert und die Zellen in einem geeigneten Verhältnis erneut ausgesät.

PBS (PHOSPHATE BUFFERED SALINE)

NaCl	140 mM
KCl	3 mM
Na ₂ HPO ₄	4 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
• pH 7,0 – 7,7	

4.2.1.2 Gewinnung und Kultivierung primärer Rattennierenzellen

Aus 5 – 6 Tage alten *Sprague-Dawley*-Ratten wurden die Nieren unter semisterilen Bedingungen entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in einem 50 ml Reaktionsgefäß (Greiner) in sterilem PBS bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die Nieren wurden dann unter sterilen Bedingungen mit Pinzette und Skalpell in einer Petrischale mechanisch zerkleinert und in ein 50 ml Röhrchen (Greiner) überführt. Je 20 Nieren wurden in 20 ml PBS mit 1 mg/ml Collagenase/Dispase (Roche) bei 37 °C für 3 – 4 h unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation (2000 UpM, 4 °C, 10 min; Rotixa 50RS, Hettich) wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet zweimal mit je 20 ml PBS gewaschen und in DMEM-Medium (Gibco BRL) mit 10 % inaktiviertem, fötalem Kälberserum (Pan; 4.2.1.1) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Pan) resuspendiert und kultiviert. Schließlich wurden die Zellen von je 4 Nieren in eine 175 cm²-Zellkulturflasche mit vorgewärmten Medium ausgesät und im CO₂-Brutschrank (Heraeus) in 7 %iger CO₂-Atmosphäre bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt und die Zellen wie beschrieben (4.2.1.1) weiterkultiviert.

4.2.1.3 Lagerung von Säugerzellen

Für die dauerhafte Lagerung wurden subkonfluente Säugerzellen von der Zellkulturunterlage abgelöst (4.2.1.1), das Zellsediment in 1 ml fötalem Kälberserum mit 10 % DMSO (Sigma) aufgenommen und in *CryoTubes*TM (Nunc) überführt. Die Zellen wurden schrittweise bei –20 °C für 2 h, bei –80 °C für 24 h eingefroren und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zur Rekultivierung wurden die tiefgefrorenen Zellen rasch bei 37 °C aufgetaut, in Zellkulturflaschen (Falcon) mit vorgewärmten Medium überführt und über Nacht kultiviert (4.2.1.1). Am Folgetag wurde das Medium gewechselt.

4.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Trypsinierte Zellen (4.2.1.1) wurden je nach Zelldichte verdünnt und ein Aliquot mit

Trypanblaulösung versetzt. Da dieser Farbstoff nur in tote Zellen eindringt können diese leicht von lebenden, ungefärbten Zellen unterschieden werden. Die vorbereitete Zellsuspension wurde in die Zählkammer überführt und die Zellen aus 16 Kleinquadraten des Kammer-Rasters im inversen Lichtmikroskop (Leica DM IL) ausgezählt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung ergibt sich nach Multiplikation mit dem Faktor 10^4 die Zellzahl pro ml der trypsinierten Zellen.

TRYPANBLAU-LÖSUNG	Trypanblau	0,15 %
	NaCl	0,89 %

4.2.3 Transfektion von Säugerzellen

4.2.3.1 Kalziumphosphat-Transfektion von Säugerzellen

Adhärenente Säugerzellen wurden nach der Kalziumphosphat-Methode (Graham und van der Eb, 1973) in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (*6-well* Schale; Falcon) oder Zellkulturpetrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm (Falcon) transfiziert. Die Methode beruht auf der Bildung von Kalziumphosphat-Kristallen, welche die zu transfizierende DNA einschließen, an der Zelloberfläche adsorbieren und phagozytiert werden.

Die Zellen wurden in einer Dichte von $2,5 \times 10^4$ Zellen/cm² in die Zellkulturschalen ausgesät und über Nacht inkubiert (4.2.1.1). Eine Stunde vor Transfektionsbeginn wurde das Medium gewechselt. Für die Transfektion einer Petrischale wurden 500 µl $2 \times$ BBS (*BES buffered saline*) in Polystyren-Reaktionsröhrchen (Falcon) vorgelegt und 30 µg Gesamt-DNA in 500 µl sterilem CaCl₂ (250 mM) unter leichtem Mischen (Vortex, 1000 UpM) zugetropft. Für die Transfektion einer Zellkulturschale mit sechs Vertiefungen (*6-well* Schale; Falcon) wurden 10 µg Gesamt-DNA in 300 µl sterilem CaCl₂ (250 mM) und 300 µl $2 \times$ BBS wie beschrieben verwendet. Nach Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur wurde die Transfektionslösung mit dem ausgebildeten Präzipitat auf die Zellen getropft und kurz geschwenkt. Nach 12 – 18 h im

Brutschrank wurde das Medium gewechselt und die transfizierten Zellen je nach Versuchsansatz entsprechend weiterkultiviert.

2` BBS	BES	50 mM
	NaCl	280 mM
	Na ₂ HPO ₄	1,5 mM
	• ph 7,02	

4.2.3.2 Lipofektion von Säugerzellen

Neben der Transfektion mittels der Kalziumphosphat-Methode wurden Zellen durch Lipofektion unter Verwendung des *Lipofectamine*-Reagenz (Invitrogen) zusammen mit dem *Plus*-Reagenz (Invitrogen) nach Anweisungen des Herstellers transfiziert. Für die Transfektion von adhärennten Zellen in 10 cm-Zellkulturschalen wurde die DNA in einem Gesamtvolumen von 730 µl DMEM-Medium ohne fötalem Kälberserum mit 20 µl *Plus*-Reagenz gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel wurden 30 µl *Lipofectamine*-Reagenz mit 720 µl DMEM-Medium ohne fötalem Kälberserum versetzt. Anschließend wurden beide Ansätze vereint und erneut 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde tropfenweise zu den mit 5 ml DMEM-Medium ohne fötalem Kälberserum überschichteten Zellen gegeben und für 3 h im Brutschrank inkubiert (4.2.1.1). Schließlich wurde mit DMEM-Medium auf ein Gesamtvolumen von 10 ml mit einer Gesamtkonzentration von 10 % fötalem Kälberserum aufgefüllt und die Zellen kultiviert (4.2.1.1). Analog erfolgte die Transfektion in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (*6-well*, Falcon) unter Verwendung von 6 µl *Plus*-Reagenz in 100 µl DNA-Medium-Lösung, 4 µl *Lipofectamine*-Reagenz in 100 µl Medium und einem Tranfektionsvolumen von 800 µl. Schließlich wurde in diesem Maßstab auf 3 ml Medium mit insgesamt 10 % fötalem Kälberserum aufgefüllt.

4.2.4 Transformation primärer Zellen

Je 3×10^6 primäre Rattennierenzellen (4.2.1.2) wurden auf eine 10 cm-Zellkulturschale (Falcon) in DMEM-Medium (Gibco BRL) mit 10 % fötalem Kälberserum (Pan) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Pan) ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen transfiziert (4.2.3).

Drei Tage nach Transfektion wurden die Zellen trypsiniert (4.2.1.1) und auf jeweils drei 10 cm-Petrischalen (Falcon) ausgesät. Danach wurde jeden vierten Tag das Medium gewechselt. Innerhalb von 3–4 Wochen starben die meisten nicht transfizierten Zellen ab, wohingegen immortalisierte und transformierte Zellen Kolonien (*Foci*) bildeten. Diese wurden durch eine Kristallviolett-Lösung gefärbt und ausgezählt.

KRISTALLVIOLETT- LÖSUNG	Kristallviolett	1 % (w/v)
	Methanol	25 % (v/v)

4.3 Adenoviren

Es wurden $2,5 \times 10^4$ Zellen/cm² in Zellkulturschalen ausgesät und über Nacht inkubiert (4.2.1.1). Die Zellen wurden nach Absaugen des Mediums mit PBS gewaschen und mit einer *multiplicity of infection* (moi) von zehn *fluorescence forming units* (ffu) mit Adenoviren in einem geeigneten Volumen Infektionspuffer (800 µl für Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen, 3 ml für 10 cm-Zellkulturpetrischalen; Falcon) überschichtet. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 1 h unter gelegentlichem Schwenken der Zellkulturschalen, um die Adsorption der Viruspartikel zu gewährleisten. Anschließend wurde die Infektionslösung abgesaugt, die Zellen mit Medium (4.2.1.1) überschichtet (3 ml für Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen, 10 ml für 10 cm-Zellkulturschalen; Falcon) und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert (4.2.1.1).

INFEKTIONSPUFFER	CaCl ₂	2 mM
	MgCl ₂	2 mM
	fötale Kälberserum	0,2 %
	in PBS	

4.4 DNA-Techniken

4.4.1 Präparation von DNA

4.4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur analytischen Isolierung kleiner Mengen an Plasmid-DNA wurde ein modifiziertes Verfahren der alkalischen Lyse (Beck *et al.*, 1993) verwendet.

Aus einer 5 ml-Übernachtskultur (4.1.1) wurden 1,5 ml entnommen, abzentrifugiert (14000 UpM, 4 °C, 2 min; *Centrifuge* 5417R, Eppendorf) und das Zellsediment in 200 µl Puffer A resuspendiert. Zum Aufschluss der Zellen wurden 400 µl Puffer B zugefügt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 300 µl Puffer C versetzt. Nach einem Zentrifugationsschritt (14000 UpM, 4 °C, 15 min; *Centrifuge* 5417R, Eppendorf) wurde der plasmidhaltige Überstand mit 500 µl Isopropanol präzipitiert und durch erneute Zentrifugation (14000 UpM, 4 °C, 15 min; *Centrifuge* 5417R, Eppendorf) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Sediment mit 1 ml EtOH_{abs} gewaschen, getrocknet und in 50 µl H₂O_{bid} gelöst.

PUFFER A	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNase A	100 µg/ml
	• Lagerung bei 4 °C	

PUFFER B	NaOH	200 mM
	SDS	1 % (w/v)

PUFFER C	Ammoniumacetat	7,5 M
	• Lagerung bei 4 °C	

Die präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus 100 – 1000 ml Übernachtskulturen wurde mit AX 100 und AX 500 Anionenaustauscher-Säulen (Macherey Nagel) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.4.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde fotometrisch (SmartSpec™ 3000; BioRad) in einer Quartzküvette (1 cm Schichtdicke) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei entspricht bei doppelsträngiger DNA eine Absorption von 1,0 bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml.

4.4.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

DNA-Proben (20 ng – 10 µg) wurden sowohl für analytische als auch präparative Zwecke in 0,8 – 1,5 %igen Agarosegelen (w/v) elektrophoretisch aufgetrennt. Eine entsprechende Menge Agarose (*Seakem® LE agarose*, FMC Bioproducts) wurde in 1 × TBE-Puffer in einer Mikrowelle (Sharp) durch aufkochen gelöst, auf ca. 50 °C abgekühlt und zur späteren Detektion der DNA mit 50 ng/ml Ethidiumbromid versetzt. Die noch flüssige Agaroselösung wurde in eine vorbereitete Flachbettgelapparatur gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Vol. Auftragspuffer versetzt und auf das verfestigte Agarosegel aufgetragen. Zur Auftrennung wurde ein elektrisches Feld mit 5 – 10 V pro cm Elektrodenabstand angelegt. Analytische Gele wurden auf einem UV-Durchlichtschirm (Bachofer) bei einer Wellenlänge von 312 nm visualisiert und dokumentiert (Gel Print 2000i; MWG-Biotech). Präparative Gele wurden zur Schonung der DNA mit langwelligem UV-Licht bei 365 nm detektiert.

10 ´ TBE

Tris
Borsäure
EDTA
• zum Gebrauch entsprechend verdünnt

DNA-AUFTRAGSPUFFER

Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylencyanol	0,25 % (w/v)
Glyzerin	50 % (v/v)
EDTA	10 mM

4.4.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde mit kommerziellen Anionenaustauscher-Säulen (*NucleoSpin Extract*, Macherey Nagel; *QIAquick Gelextraction Kit*, Qiagen) nach Anweisung der Hersteller durchgeführt. Je nach erwarteter Menge wurde die DNA mit 25 – 50 µl der jeweiligen Elutionspuffer (auf 56 °C vorgewärmt) eluiert.

4.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*; Saiki *et al.*, 1988) wurde verwendet um *in vitro* definierte DNA-Fragmente zu vermehren oder mit entsprechenden Sequenzenden zu versehen.

Für einen 50 µl Standard-Reaktionsansatz wurden auf Eis 10 – 100 ng Matrizen-DNA, je 25 pmol der entsprechenden Oligonukleotide, 10 nmol dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 2,5 nmol), 5 µl 10 × PCR-Puffer und 5 U Polymerase-Mix (*Expand High Fidelity PCR System*, Roche) in dünnwandige 0,2 ml Reaktionsgefäße (Biozym) pipettiert. Der Ansatz wurde nach der *good start* Methode direkt vom Eis in den auf 95 °C vorgeheizten Thermocycler (*GeneAmpTMPCR System 9700*, Perkin Elmer) gegeben und die Matrizen-DNA durch eine Initialinkubation bei 95 °C für 30 s denaturiert. Direkt im Anschluss wurde folgende Drei-Stufen-PCR durchgeführt:

95 °C	30 s
56 – 60 °C	30 s
68 – 72 °C	1 min pro kb der Zielsequenz

Dieser Zyklus wurde 15 – 35 mal durchlaufen, gefolgt von einer abschließenden Inkubation bei 72 °C für 7 min. Je 5 µl der amplifizierten DNA wurden elektrophoretisch analysiert (4.4.3).

4.4.6 Klonierung von DNA

4.4.6.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme

Spaltungen wurden mit 0,5 – 5 µg DNA und 3 – 10 U der entsprechenden Restriktionsendonukleasen in den von den Herstellern (New England Biolabs und Roche) empfohlenen Puffern in einem Volumen von 20 – 50 µl durchgeführt. Spaltungen mit unterschiedlich gepufferten Enzymen wurden sequenziell durchgeführt, mit einer Fällung der DNA (4.1.2) vor dem Wechsel des Enzyms. Die Ansätze wurden bei 37 °C für 1 – 2 h inkubiert und anschließend die DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt (4.4.3) und gegebenenfalls aus dem Gel gereinigt (4.4.4).

4.4.6.2 Ligation und Transformation

Vektor-DNA wurde direkt nach Spaltung mit 1 U alkalischer Phosphatase (Roche) bei 37 °C für 30 min dephosphoryliert, dann elektrophoretisch aufgetrennt (4.4.3) und aus dem Gel isoliert (4.4.4). Ligationen wurden mit 100 ng Vektor-DNA sowie der dreifachen molaren Menge an zu klonierender Fremd-DNA in einem Volumen von 20 - 30 µl mit 1 U T4-DNA-Ligase im entsprechenden Puffer (Roche) durchgeführt. Dazu wurde der Ansatz bei 12 °C über Nacht inkubiert und anschließend zur Transformation von *E. coli* eingesetzt (4.1.2).

4.4.6.3 Identifikation rekombinanter Klone

Transformierte *E. coli* wurden auf LB-Agarplatten (100 µg/ml Ampicillin) selektiert, 5 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) mit einer Einzelkolonie angeimpft (4.1.1.1) und die Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse (4.4.1.1) isoliert. Rekombinante DNA wurde mit geeigneten Restriktionsenzymen gespalten (4.4.6.1), elektrophoretisch aufgetrennt (4.4.3) und anhand des Spaltungsmusters identifiziert. Abschließend wurden Plasmid-Klone durch DNA-Sequenzierung (4.4.7) verifiziert und als Glycerinkultur (4.1.1.3) aufbewahrt.

4.4.7 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden 300 ng Plasmid-DNA und 6 pmol eines Oligonukleotids mit H₂O_{bid} auf ein Endvolumen von 8 µl aufgefüllt und kommerziell sequenziert (GeneArt). In speziellen Fällen wurden die Sequenzierungen von Holger Melzl am Institut durchgeführt, wobei 600 ng DNA mit 6 pmol Oligonukleotid im doppelten Reaktionsansatz (*Prism Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit*, Applied Biosystems) verwendet wurden. Im Anschluss wurde eine Amplifikation mit 60 Zyklen (96 °C, 15 s; 55 °C, 15 s; 60 °C, 4 min) durchgeführt, die Reaktionsprodukte nach Angabe des Herstellers gereinigt und in einem 7 %igen Polyacrylamid-Sequenziergel aufgetrennt. Die Auswertung der Primärdaten erfolgte mit dem Programm SeqEd™ (Version 1.0.3, Applied Biosystems).

4.5 RNA-Techniken

4.5.1 Präparation von RNA aus Säugerzellen

Die Isolierung kleinerer Mengen mRNA für RT-PCR-Analysen (4.5.4) und zur Bestimmung von Transkriptionsstarts (4.5.5) wurde mit dem *RNeasy*® Mini-System (Qiagen) durchgeführt. Es wurde sowohl das Protokoll zur Isolierung von Gesamt- als auch von zytoplasmatischer RNA angewendet, wobei darauf geachtet wurde, RNase-Kontaminationen zu vermeiden. Alle Lösungen wurden mit RNase-freiem

H₂O_{DEPC} hergestellt. Dazu wurden 0,01 % DEPC (v/v) in H₂O_{bid} gegeben, über Nacht inkubiert und dann autoklaviert.

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurden $3 - 4 \times 10^6$ Zellen von der Zellkulturunterlage abtrypsinisiert (4.2.1.1) und mit 350 µl RLT-Puffer (Qiagen) lysiert. Zur Homogenisierung des Rohlysats (ermöglicht die Abtrennung genomischer DNA) wurden *QIAshredder spin columns* (Qiagen) verwendet. Die weitere Aufreinigung der RNA erfolgte nach Angabe des Herstellers (Qiagen).

Zur Gewinnung zytoplasmatischer RNA wurden die intakten Zellkerne mit den nukleären Nukleinsäuren von der zytoplasmatischen Fraktion abgetrennt. Dazu wurden $3 - 4 \times 10^6$ Zellen abtrypsinisiert (4.2.1.1) und das Zellpellet in 175 µl eiskaltem RLN-Puffer resuspendiert. Nach Inkubation für 5 min auf Eis wurde zentrifugiert (1500 UpM, 4 °C, 2 min; *Centrifuge 5417R*, Eppendorf) und der Überstand in einem frischen 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) mit 600 µl RLT-Puffer gründlich gemischt. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach Anweisung des Herstellers (Qiagen). Die isolierte RNA wurde grundsätzlich bei -80 °C gelagert.

RLN-PUFFER

Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
NaCl	140 mM
MgCl ₂	1,5 mM
Nonidet P-40	0,5 % (v/v)
• in H ₂ O _{DEPC}	
• Lagerung bei 4 °C	
• DTT (vor Gebrauch)	1 mM

4.5.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration von RNA wurde fotometrisch (SmartSpec™ 3000; BioRad) in einer Quartzküvette (1 cm Schichtdicke) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine Absorption von 1,0 bei 260 nm einer Konzentration von 40 µg/ml.

4.5.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

RNA-Proben (100 ng – 10 µg) wurden in 1,2 %igen (w/v) Formaldehyd-Agarose (FA)-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Für 200 ml Gellösung wurden 2,4 g Agarose (*Seakem[®] LE agarose*, FMC Bioproducts) und 20 ml 10 × FA-Gel-Puffer in H₂O_{DEPC} in einer Mikrowelle (Sharp) durch aufkochen gelöst, auf ca. 65 °C abgekühlt und mit 3,6 ml Formaldehyd (37 %) sowie 100 ng/ml Ethidiumbromid versetzt. Die noch flüssige Agaroselösung wurde in eine vorbereitete Flachbettgelapparatur gegossen. Unmittelbar vor Gebrauch wurde das Gel für mindestens 30 min in 1 × FA-Laufpuffer äquilibriert. Die RNA-Proben wurden mit 1/5 Vol. RNA-Auftragspuffer versetzt, 5 min bei 65 °C denaturiert, auf Eis gekühlt und auf das FA-Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in einem elektrischen Feld mit 5 – 7 V pro cm Elektrodenabstand. Die Gele wurden auf einem UV-Durchlichtschirm (Bachofer) bei einer Wellenlänge von 312 nm visualisiert und dokumentiert (Gel Print 2000i; MWG-Biotech).

10 × FA-GEL-PUFFER	MOPS	200 mM
	NaOAc	50 mM
	EDTA	10 mM
	• in H ₂ O _{DEPC}	
	• pH 7,0 mit NaOH	

1 × FA-LAUFPUFFER	10 × FA-Gel-Puffer	100 ml
	Formaldehyd, 37 %	20 ml
	H ₂ O _{DEPC}	880 ml

RNA-AUFTRAGSPUFFER		
	Bromphenolblau (gesättigte Lösung)	16 µl
	EDTA, 500 mM, pH 8,0	80 µl
	Formaldehyd, 37 %	720 µl
	Glyzerin, 100 %	2 ml
	Formamid	3084 µl
	10 × FA-Gel-Puffer	4 ml
	H ₂ O _{DEPC}	2 ml
	• Lagerung bei 4 °C (3 Monate stabil)	

4.5.4 RT-PCR-Analysen

Bei der RT-PCR wird zunächst der mRNA-Strang durch reverse Transkription in den cDNA-Erststrang (*complementary DNA*) umgeschrieben und anschließend durch PCR (4.4.5) *in vitro* vermehrt. Für die cDNA-Erststrang-Synthese wurde das *SuperScript™ First-Strand Synthesis System* von Invitrogen verwendet.

In 0,2 ml Reaktionsgefäße (Biozym) wurden 0,1 – 5 µg zytoplasmatische oder Gesamt-RNA, 1 µl dNTP-Mix (10 mM) und 1 µl Oligo(dT)₁₇-Oligonukleotid (0,5 µg/µl) in einem Gesamtvolumen von 10 µl H₂O_{DEPC} bei 65 °C für 5 min denaturiert und 1 min auf Eis gekühlt. Dann wurden 2 µl 10 × RT-Puffer, 4 µl MgCl₂ (25 mM), 2 µl DTT (0,1 M) und 1 µl *RNaseOUT™* (RNase-Inhibitor) zugefügt und 2 min bei 42 °C inkubiert. Die reverse Transkription wurde mit 1 µl *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* (200 U/µl) bei 42 °C für 50 min durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 70 °C für 15 min terminiert und die Matrizen-RNA durch Zufügen von 1 µl RNaseH, 1 µl RNase T1 (Roche) und Inkubation bei 37 °C für 30 min abgebaut. Die gewonnene cDNA wurde im Anschluss entweder bei -20 °C gelagert oder sofort durch PCR (4.4.5) *in vitro* vermehrt.

4.5.5 Bestimmung von Transkriptionsstarts

Die Bestimmung von Transkriptionsstarts wurde mit dem System *5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0* (Invitrogen) durchgeführt. Das Prinzip

beruht auf der Verlängerung der nach reverser Transkription erhaltenen cDNA mittels der Terminalen Desoxynukleotid-Transferase (TdT) durch ein Homopolymer, welches als Bindestelle für ein Anker-Oligonukleotid verwendet wird. Diese Methode erlaubt auch bei unbekannter Sequenz des 5' Bereichs eines Transkripts die Amplifikation der cDNA und ermöglicht weitergehende Analysen. Das Protokoll ist dabei in mehrere Schritte gegliedert: cDNA-Erststrang-Synthese, Aufreinigung der cDNA, homopolymere Verlängerung der cDNA, cDNA-Zweitstrang-Synthese und Aufreinigung des Zweitstrang-Synthese-Produkts. Alle notwendigen Reagenzien sind Bestandteil des Systems.

4.5.5.1 Reverse Transkription

Es wurden 0,1 – 5 µg Gesamt-RNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl H₂O_{DEPC} in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß (Biozym) pipettiert, 5 µl Oligonukleotidlösung (1 µM) zugefügt, 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf 50 °C abgekühlt. Der auf 50 °C vorgewärmte Reaktionsmix, bestehend aus 6,5 µl H₂O_{DEPC}, 5 µl 10 × PCR-Puffer, 5 µl MgCl₂ (25 mM), 2,5 µl dNTP-Mix (10 mM) und 5 µl DTT (0,1 M) wurde zugegeben. Die cDNA-Synthese wurde mit 1 µl *SuperScriptTM II Reverse Transcriptase* (200 U/µl) gestartet und bei 50 °C für 50 min durchgeführt. Die Reaktion wurde bei 70 °C für 15 min terminiert und kurz auf Eis gekühlt. Die Matrizen-RNA wurde durch Zufügen von 1 µl RNase-Mix für 30 min bei 37 °C abgebaut.

4.5.5.2 Aufreinigung von cDNA

Zum Reaktionsansatz wurden 225 µl Bindungslösung gegeben, gemischt und auf die *GLASSMAX* (Invitrogen)-Reinigungssäulen pipettiert. Nach Zentrifugation (13000 UpM, 4 °C, 20 s; *Centrifuge 5417R*, Eppendorf) wurde viermal mit 0,4 ml kaltem Waschpuffer und zweimal mit 0,4 ml kaltem EtOH_{70%} gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Säule trocken zentrifugiert (13000 UpM, 4 °C, 1 min; *Centrifuge 5417R*, Eppendorf) und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt. Die cDNA wurde mit 50 µl, auf 65 °C erwärmtes H₂O_{bid} von der Säule durch Zentrifugation (13000 UpM, 21 °C, 20 s; *Centrifuge 5417R*, Eppendorf) eluiert.

Alternativ wurde die Aufreinigung mit dem *QIAquick Gelextraction Kit* (Qiagen) mit den oben genannten Reagenz-Volumina durchgeführt.

4.5.5.3 Homopolymere Verlängerung von cDNA

Es wurden in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) 6,5 µl H₂O_{bid}, 5 µl 5 × *tailing* Puffer, 2,5 µl dATP (2 mM) sowie 10 µl der aufgereinigten cDNA pipettiert, bei 94 °C für 3 min denaturiert und 1 min auf Eis gekühlt. Durch Zufügen von 1 µl TdT und Inkubation bei 37 °C für 10 min wurde die cDNA-Verlängerung durchgeführt und bei 65 °C für 10 min terminiert.

4.5.5.4 cDNA-Zweitstrang-Synthese

Zum kompletten TdT-Ansatz wurden 8 µl H₂O_{bid}, 4 µl 10 × PCR-Puffer, 3,5 µl MgCl₂, 5 µl DTT (0,1 M), 2,5 µl dNTP-Mix (10 mM) und 1 µl des entsprechenden Anker-Oligonukleotids (10 µM) gegeben und für 2 min bei 95 °C äquilibriert. Durch Zufügen von 1 µl Polymerase-Mix (*Expand High Fidelity PCR System*, Roche) und Inkubation bei 72 °C für 50 min wurde die Zweitstrang-Synthese durchgeführt. Das Produkt wurde erneut aufgereinigt (4.5.5.2) und mittels PCR *in vitro* vermehrt (4.4.5).

4.6 Protein-Techniken

4.6.1 Gesamtzellextrakt aus Säugerzellen

Für die Zellernte wurde zuerst das Medium abgesaugt, mit PBS vorsichtig gespült, die Zellen abtrypsiniert (4.2.1.1) und in ein 15 ml Reaktionsgefäß (Greiner) überführt. Nach Zentrifugation (1500 UpM, 21 °C, 3 min; Rotixa 50RS, Hettich) wurde das Zellpellet mit PBS gewaschen, zentrifugiert (1500 UpM, 21 °C, 3 min; Rotixa 50RS, Hettich) und das erhaltene Zellsediment entweder bei -80 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

Zum Aufschluss der Zellen wurden diese in einem geeigneten Volumen RIPA-Puffer resuspendiert und 30 min auf Eis gestellt. Zur Homogenisierung des Rohlysats

wurde dieses zweimal mit Ultraschall (je 25 s, *output* 0,45, 0,6 Impulse/s; Branson Sonifier 450) behandelt, wobei die Reaktionsgefäße zwischen den Sonifikationsschritten auf Eis gelagert wurden. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt, zentrifugiert (14000 UpM, 4 °C, 10 min; *Centrifuge* 5417R, Eppendorf) und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt.

RIPA	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	Nonidet P-40	1 % (v/v)
	SDS	0,1 % (w/v)
	Na-Desoxycholat	0,5 % (w/v)

4.6.2 Fraktionierter Zellaufschluss von Säugerzellen

Zur Untersuchung der intrazellulären und intranukleären Lokalisation von Proteinen wurden zytoplasmatische Proteine abgetrennt (Kawaguchi *et al.*, 1997) und anschließend eine Fraktionierung der subnukleären Kompartimente (Fey *et al.*, 1984, Spector *et al.*, 1998) durchgeführt.

Die Zellen wurden geerntet (4.6.1) und die erhaltenen Zellsedimente in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) mit 300 µl kaltem Zytoplasma-Puffer gründlich resuspendiert. Zur Lyse der Zytoplasmamembranen wurde der Ansatz auf 0,1 % Nonidet P-40 gebracht und 5 min auf Eis inkubiert. Die Zellkerne wurden abzentrifugiert (14000 UpM, 4 °C, 5 min; *Centrifuge* 5417R, Eppendorf) und der Überstand als zytoplasmatische Fraktion in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt. Zur weiteren Fraktionierung wurden die Zellkerne in 60 µl eiskaltem CSK-Puffer resuspendiert und 4 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (8000 UpM, 4 °C, 5 min; *Centrifuge* 5417R, Eppendorf) wurde der Überstand als nukleoplasmatische Fraktion in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt, das Sediment in 60 µl Extraktions-Puffer resuspendiert und

4 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (8000 UpM, 4 °C, 5 min; *Centrifuge 5417R*, Eppendorf) wurde der Überstand als Histon H1-Fraktion in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) transferiert, das Pellet in 60 µl DNase I-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 2 µl DNase I (10 U/µl), Inkubation bei 37 °C für 1 h und anschließender Zentrifugation (8000 UpM, 4 °C, 10 min; *Centrifuge 5417R*, Eppendorf) wurde die Chromatin-Fraktion als Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt. Das verbleibende Sediment wurde als nukleäre Matrix-Fraktion in 300 µl RIPA-Puffer (4.6.1) solubilisiert. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (4.6.6) und *Western Blot* (4.6.8) analysiert.

ZYTOPLASMA-PUFFER	HEPES, pH 7,4	10 mM
	NaCl	10 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
	• <i>complete EDTA-free</i> Protease-Inhibitoren (Roche)	

CSK-PUFFER	PIPES, pH 6,8	10 mM
	Saccharose	300 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	3 mM
	EGTA	1 mM
	Triton X-100	0,5 % (v/v)
	<i>Vanadyl Riboside Complex</i>	2 mM
• <i>complete EDTA-free</i> Protease-Inhibitoren (Roche)		

EXTRAKTIONS-PUFFER	PIPES, pH 6,8	10 mM
	Ammoniumsulfat	250 mM
	Saccharose	300 mM
	MgCl ₂	3 mM
	EGTA	1 mM
	<i>Vanadyl Riboside Complex</i>	2 mM
	• <i>complete EDTA-free</i> Protease-Inhibitoren (Roche)	

DNASE I-PUFFER	PIPES, pH 6,8	10 mM
	Saccharose	300 mM
	NaCl	50 mM
	MgCl ₂	3 mM
	EGTA	1 mM
	Triton X-100	0,5 % (v/v)
	<i>Vanadyl Riboside Complex</i>	2 mM
	• <i>complete EDTA-free</i> Protease-Inhibitoren (Roche)	

4.6.3 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Die Expression rekombinanter Proteine erfolgte als Fusion mit Glutathion S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* (Smith und Johnson, 1988) unter Verwendung des *GST Gene Fusion Systems* (Pharmacia). Die induzierbare Expression erlaubt hohe Proteinausbeuten, der GST-Anteil der Fusionsproteine eine effiziente affinitätschromatografische Aufreinigung.

4.6.3.1 Expression

Die kodierende Sequenz eines Proteinfragments wurde im Leserahmen in ein Expressionsplasmid kloniert (4.4.6) und eine Übernachtskultur (4.1.1.1) in LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin angelegt. Diese wurde 1 : 10 in vorgewärmtes LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin) verdünnt und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ (4.1.1.1) von 0,6 - 0,8 inkubiert (37 °C, 220 UpM; New Brunswick). Die Proteinexpression wurde mit 1 mM IPTG induziert und bei 37 °C für weitere 4 h durchgeführt.

4.6.3.2 Zellaufschluss

Die induzierte Bakterienkultur wurde zentrifugiert (6000 UpM, 4 °C, 10 min; Centrikon T-124, Kontron Instruments), das Sediment in kaltem PBS resuspendiert und in 50 ml Reaktionsgefäße (Greiner) überführt. Nach erneuter Zentrifugation (6000 UpM, 4 °C, 10 min; Rotixa 50RS, Hettich) wurde das Sediment in 10 ml NETN-

Puffer pro 500 ml Kulturvolumen resuspendiert, mit Protease-Inhibitoren versetzt (*complete EDTA-free*, Roche) und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren. Nach erneutem Auftauen wurde pro 10 ml Suspension 1 Spatelspitze Lysozym (Roche), 100 μl DNase I (1 mg/ml; Roche), 130 μl MgCl_2 (1 M) und 13 μl MnCl_2 zugefügt und 10 min auf Eis inkubiert. Zum vollständigen Aufschluss der Bakterien wurde dreimal auf Eis sonifiziert (1 min, *output* 0,45, 0,5 Impulse/s; Branson Sonifier 450). Schließlich wurde das Lysat auf eine NaCl-Endkonzentration von 0,5 M und einen Triton X-100-Gehalt von 1 % gebracht.

4.6.3.3 Affinitätsreinigung

Zur Sedimentation unlöslicher Bestandteile wurde das Rohlysate zentrifugiert (15000 UpM, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min; Centrikon T-124, Kontron Instruments) und der Überstand in ein frisches 50 ml Reaktionsgefäß (Greiner) transferiert. Parallel wurden pro 10 ml Rohlysate 700 μl der Glutathion-Sepharose-Suspension (Pharmacia) zweimal mit PBS gewaschen, zentrifugiert (2500 UpM, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 min; Rotixa 50RS, Hettich) und mit 10 ml PBS mit 0,5 M NaCl und 1 % Triton X-100 auf Eis äquilibriert. Nach erneuter Zentrifugation (2500 UpM, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 min; Rotixa 50RS, Hettich) wurde die Sepharose-Matrix in 500 μl PBS mit 0,5 M NaCl und 1 % Triton X-100 resuspendiert, zum geklärten Lysat gegeben und für 2 h bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf einem Drehrotor (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) inkubiert. Nach Zentrifugation (2500 UpM, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 min; Rotixa 50RS, Hettich) wurde das Sediment einmal mit 10 ml PBS mit 1 % Triton-X-100, einmal mit PBS gewaschen und jeweils zentrifugiert (2500 UpM, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 min; Rotixa 50RS, Hettich). Schließlich wurde die Sepharose-Matrix in 1 ml NETN-Puffer mit 5 % Glycerin resuspendiert und in Aliquots zu 100 μl bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

NETN-PUFFER

Tris/HCl, pH 8,0	20 mM
NaCl	100 mM
EDTA	1 mM
Nonidet P-40	0,5 % (v/v)

4.6.4 Quantitative Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration löslicher Proteine in einer Probe wurde mit Hilfe des *Protein-Assays* (BioRad) nach Anweisung des Herstellers bestimmt. Dazu wurde mit dem Referenzprotein BSA (Rinderserumalbumin, Sigma) eine Eichkurve der optischen Dichte bei 595 nm (OD_{595}) mit definierten Konzentrationen erstellt und über die OD_{595} der zu vermessenden Probe deren Proteinkonzentration bestimmt. Die Proben wurden in insgesamt 800 μ l PBS mit 200 μ l Färbereagenz 5 – 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei 595 nm gegen den Nullwert (800 μ l PBS + 200 μ l Färbereagenz) fotometrisch bestimmt.

4.6.5 Radioaktive Markierung durch In-vitro-Transkription/Translation

Zur gekoppelten In-vitro-Transkription/Translation klonierter cDNA wurde das *TNT T7-coupled Reticulocyte Lysate System* (Promega) nach Anweisung des Herstellers eingesetzt. Zur Markierung der Proteine wurde ^{35}S -markiertes L-Methionin (50 μ Ci) zugegeben. Nach Abschluss der Reaktion wurden 5 μ l des Ansatzes in SDS-Probenpuffer (4.6.6) aufgenommen, 5 min bei 95 °C denaturiert und einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (4.6.6) unterzogen. Die radioaktiven Signale wurden autoradiografisch detektiert. Dazu wurde das Gel zur Signalverstärkung für 2 h in *Enlight* (EnerGene) bei Raumtemperatur inkubiert und auf WhatmanTM-Filtern im Vakuumtrockner (Drysar, H. Hözl) bei 70 °C getrocknet. Die Exposition eines Röntgenfilms (X-OMATTM AR, Kodak) wurde über Nacht bei -80 °C durchgeführt. Außerdem wurde das *Phospho-Imager System Personal FX* (BioRad) verwendet.

4.6.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Der Aufbau der Gelapparaturen und das Gießen der Gele erfolgte nach Angaben der Hersteller (Biometra, BioRad, Hoefer). Nachdem das Trenngel mit dem erforderlichen Acrylamid-Anteil auspolymerisiert war, wurde das Sammelgel überschichtet, ein Teflon-Kamm eingesetzt und nach Auspolymerisierung des Sammelgels die Probenfächer mit TGS-Puffer gespült.

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit SDS-Probenpuffer (zweifach konzentriert) versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 20 mA pro Gel in TGS-Puffer.

30 % ACRYLAMID-STAMMLÖSUNG	Acrylamid	29 % (w/v)
	N, N'-Methylenbisacrylamid	1 % (w/v)
SAMMELGEL (5 %)	Acrylamid-Stammlösung	17 % (v/v)
	Tris/HCl, pH 6,8	120 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	APS	0,1 % (w/v)
	TEMED	0,1 % (v/v)
TRENNGEL (6 %)	Acrylamid-Stammlösung	20 % (v/v)
	Tris/HCl, pH 8,8	250 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	APS	0,1 % (w/v)
	TEMED	0,04 % (v/v)
TRENNGEL (12 %)	Acrylamid-Stammlösung	40 % (v/v)
	Tris/HCl, pH 8,8	250 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	APS	0,1 % (w/v)
	TEMED	0,04 % (v/v)
TGS-PUFFER	Tris	25 mM
	Glycin	200 mM
	SDS	0,1 % (w/v)

SDS-PROBENPUFFER	Tris/HCl, pH 6,8	100 mM
	SDS	4 % (w/v)
	DTT	200 mM
	Bromphenolblau	0,2 % (w/v)
	Glyzerin	20 %

4.6.7 Färbung von Polyacrylamidgelen

Der Nachweis von Gesamtprotein in SDS-Polyacrylamidgelen nach der elektrophoretischen Auftrennung (4.6.6) wurde entweder durch kolloidale Coomassie-Färbung (*Deep Blue*, EnerGene) oder durch Silberfärbung (*Silver Surfer*, EnerGene) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Zur Dokumentation wurden die Gele anschließend in Zellophan-Folien nach Anweisung des Herstellers getrocknet (Easy Breeze Gel Dryer, Hoefer).

4.6.8 Western Blot

4.6.8.1 Proteintransfer auf Nitrozellulose

Nach Abschluss der elektrophoretischen Auftrennung (4.6.6) wurden Proteine nach dem *Western Blot*-Verfahren auf Nitrozellulose-Membranen (Protran, Schleicher & Schüll) übertragen. Der Elektrotransfer erfolgte mit einer *Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell* (BioRad) nach Anweisung des Herstellers in *Towbin*-Puffer bei einer Stromstärke von 400 mA für 90 min. Auf der Membran immobilisierte Proteine wurden anschließend mit Ponceau S reversibel angefärbt und das Bandenmuster des Proteinstandards markiert.

4.6.8.2 Bindung der Antikörper

Zur Absättigung freier Bindestellen wurde die Nitrozellulose-Membran mit 5 % Magermilchpulver in PBS über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Anschließend wurde die Membran in einer Lösung des spezifischen Antikörpers (verschiedene

Verdünnungen in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, dreimal 10 min mit PBS-Tween (0,1 %) gewaschen und mit einer 1 : 5000 Verdünnung (in PBS) des HRP-gekoppelten sekundären Antikörpers für 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach drei weiteren Waschschrritten mit PBS-Tween (0,1 %) wurde die Detektion (4.6.8.3) durchgeführt.

4.6.8.3 Chemilumineszenz

Für den Nachweis der Antigen-Antikörperkomplexe auf der Nitrozellulose-Membran wurde das *SuperSignal® West Pico Chemiluminescence Substrate* (Pierce) verwendet. Die Membran (4.6.8.2) wurde mit 0,125 ml/cm² Detektionslösung überschichtet und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Membran kurz abgetropft, in Folie eingeschlagen und die Signale für 2 s bis 20 min mit dem *ChemiDoc* System (BioRad) detektiert.

4.6.9 GST-Pulldown

Um Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vitro* zu untersuchen wurde ein *GST-Pulldown* durchgeführt. An Glutathion-Sepharose gekoppelte GST-Fusionsproteine (4.6.3) werden mit einem Zellextrakt oder mit radioaktiv markierten Proteinen inkubiert und interagierende Proteine kosedimentiert.

Zunächst wurde die Menge der an Glutathion-Sepharose gebundenen Fusionsproteine (4.6.3) durch SDS-Gelelektrophorese (4.6.6) und anschließender Färbung (4.6.7) bestimmt. Gleiche Proteinmengen wurden abzentrifugiert (7000 UpM, 4 °C, 5 min; *Centrifuge* 5417R, Eppendorf) und einmal mit NETN-Puffer (4.6.3) gewaschen. Das Sediment wurde in 300 µl NETN-Puffer resuspendiert und mit einer definierten Menge an radioaktiv markiertem Protein (4.6.5) versetzt. Der Ansatz wurde für 2 h bei 4 °C auf einem Drehrotor (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) inkubiert. Die Sepharose-Matrix wurde sedimentiert (7000 UpM, 4 °C, 5 min; *Centrifuge* 5417R, Eppendorf), dreimal mit Dignam-Puffern (DA-Puffer) je nach Stringenz gewaschen, zentrifugiert (7000 UpM, 4 °C, 5 min; *Centrifuge* 5417R, Eppendorf) und in 25 µl SDS-Probenpuffer (4.6.6) aufgeköcht. Die Proben wurden

durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (4.6.6) aufgetrennt und radioaktive Signale wie beschrieben (4.6.5) detektiert.

DIGNAM-PUFFER (DA-PUFFER X)	HEPES	10 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
	NaCl	X mM (X= 100, 250, 500, 1000)
	• pH 7,9 mit NaOH	

4.7 Immunfluoreszenz-Analysen

4.7.1 Direkte Fixierung mit Methanol

Subkonfluente, adhärenente Zellen wurden in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (6-well Schale, Falcon) auf sterilen Deckgläsern kultiviert (4.2.1.1). Zur Fixierung wurde das Medium abgesaugt, die Deckgläser einmal mit PBS gewaschen, mit Methanol überschichtet und für 15 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Deckgläser wurden im Anschluss bei Raumtemperatur getrocknet und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder direkt für den immunologischen Nachweis (4.7.3) der zu untersuchenden Proteine verwendet.

4.7.2 In-situ-Präparation von nukleärer Matrix und Chromatin

Zur In-situ-Präparation der nukleären Matrix (Fey *et al.*, 1984; Spector *et al.*, 1998) wurden adhärenente Zellen wie beschrieben ausgesät und inkubiert (4.7.1). Nach Absaugen des Mediums wurden die Deckgläser einmal mit PBS gewaschen und zur Abtrennung löslicher Proteine je einmal für 4 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit CSK-Puffer (4.6.2) und Extraktions-Puffer (4.6.2) inkubiert. Anschließend wurde das Chromatin durch Spaltung der DNA mit 300 U/ml DNase I in DNase I-Puffer (4.6.2) bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 1 h und zweimaligem Waschen mit Extraktionspuffer (4.6.2) bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 4 min entfernt. Die In-situ-Präparation von Chromatin erfolgte analog durch Spaltung der RNA mit 100 U/ml RNase H und 1000 U/ml RNase T1 (Roche). Schließlich wurden die

verbleibenden Fraktionen mit eiskaltem Methanol für 5 min fixiert und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Die Proben wurden entweder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder direkt zum Nachweis der Proteine (4.7.3) verwendet.

4.7.3 Immunologischer Nachweis

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurden die Deckgläser für 1h bei Raumtemperatur mit 10 %igen BSA (Sigma) in PBS abgesättigt. Die Lösung wurde abgesaugt und die Deckgläser mit 100 μl Primärantikörper in geeigneter Verdünnung in PBS mit 1 % BSA (Sigma) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 0,1 % Tween (Sigma) in PBS und einmaligem Waschen mit PBS erfolgte auf gleiche Weise die Inkubation mit fluoreszenzmarkierten, sekundären Antikörpern in einer Verdünnung von 1 : 250. Zur Anfärbung von Chromatin wurden 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI zugesetzt. Nach drei weiteren Waschschritten wurden die Deckgläser auf Objektträgern mit 10 μl *Glow Mounting Medium* (EnerGene) fixiert.

Die weitere Analyse erfolgte mit einem Leica DMR Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung eines digitalen Bildverarbeitungssystems (*Spot RT*, Diagnostic Instruments; Metavue 4.6; Visitron Systems).

4.8 Luziferase-Versuch

Zur quantitativen Bestimmung von Promotoraktivitäten wurde das *Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System* (Promega) nach Anweisung des Herstellers verwendet. Promotor-DNA-Fragmente sind in den Vektor pGL2-Basic als Kontrollelement für das Luziferasegen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* kloniert und wurden zusammen mit Expressionsplasmiden, deren Auswirkung auf die Promotoraktivität von Interesse waren, in H1299-Zellen transfiziert. Die Promotoraktivität beeinflusst die Synthese der Luziferase, deren Menge luminometrisch durch die Oxidation des Substrates Luziferin bestimmt wurde. Gleichzeitig wurden die Zellen mit dem Vektor pRL-CMV transfiziert. Das Plasmid enthält das Gen für Luziferase aus *Renilla*

reniformis unter Kontrolle des konstitutiven CMV-Promotors und fungierte als interne Referenz um Variationen im Nachweissystem zu berücksichtigen.

Für die Versuche wurden 2×10^5 H1299-Zellen in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (6-well Schale; Falcon) ausgesät und am darauf folgenden Tag mit dem Reporterplasmid (pGL2-Konstrukt), 0,1 µg Renillaplasmid (pRL-CMV) sowie unterschiedliche Mengen an Effektorplasmiden transfiziert (4.2.3). Nach 48 h wurden die Zellen lysiert. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, 500 µl *passive lysis buffer* (Promega) pro Vertiefung auf die Zellen gegeben und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lysate wurden daraufhin in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt und konnten bei -20 °C gelagert werden oder es wurden die Promotoraktivitäten nach Anleitung des Herstellers mit einem Luminometer (Lumat LB 9507, Berthold) bestimmt.

5 ERGEBNISSE

5.1 Transkriptionsregulatorisches Potenzial von E1B-AP5

Die Gruppe der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine (hnRNP) wurde ursprünglich als Hauptbestandteil matrixassoziierter RNA-Proteinkomplexe identifiziert (zur Übersicht: Dreyfuss *et al.*, 1993). Studien der letzten Jahre zeigen jedoch, dass die Verpackung naszierender RNA-Polymerase II-Transkripte durch hnRNPs nur einen kleinen Teil des funktionellen Spektrums dieser Proteinfamilie repräsentiert (zur Übersicht: Krecic und Swanson, 1999). Vor allem die Regulation der Genexpression durch verschiedene hnRN-Proteine rückt dabei in den Fokus neuerer Arbeiten die zeigen, dass viele Vorgänge der Transkription durch hnRNPs beeinflusst werden.

5.1.1 Regulation basaler Promotoraktivität durch E1B-AP5

5.1.1.1 *Luziferase-Versuche zur Regulation basaler Promotoraktivität durch E1B-AP5*

Funktionsanalysen des hnRN-Proteins SAF-A ergaben, dass dessen transiente Überexpression die basale Aktivität viraler und zellulärer Promotoren stark verringert (Kim und Nikodem, 1999). Aufgrund der auffälligen Homologiebereiche von E1B-AP5 zum SAF-A-Polypeptid stellte sich die Frage, ob E1B-AP5 über ein vergleichbares Funktionsspektrum verfügt. Um dieser Vermutung nachzugehen wurde der Einfluss der transienten Überexpression des E1B-AP5-Proteins im Vergleich zu SAF-A auf die basale Aktivität folgender viraler und zellulärer Promotoren getestet: *early*-Promotor des *simian virus 40* (SV40), E1B-Promotor des Adenovirus Serotyp 5 (Ad5-E1B), Thymidinkinase-Promotor des Herpes Simplex-Virus (TK) sowie die zellulären Promotoren für Histon 2A (H2A), *c-fos* (*fos*) und E1B-AP5. Die Aktivität der Promotoren wurde mit dem *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega) nach Angaben des Herstellers bestimmt (4.8; Abb. 7). Die Auswertung der Daten ergab, dass die transiente Überexpression von SAF-A wie

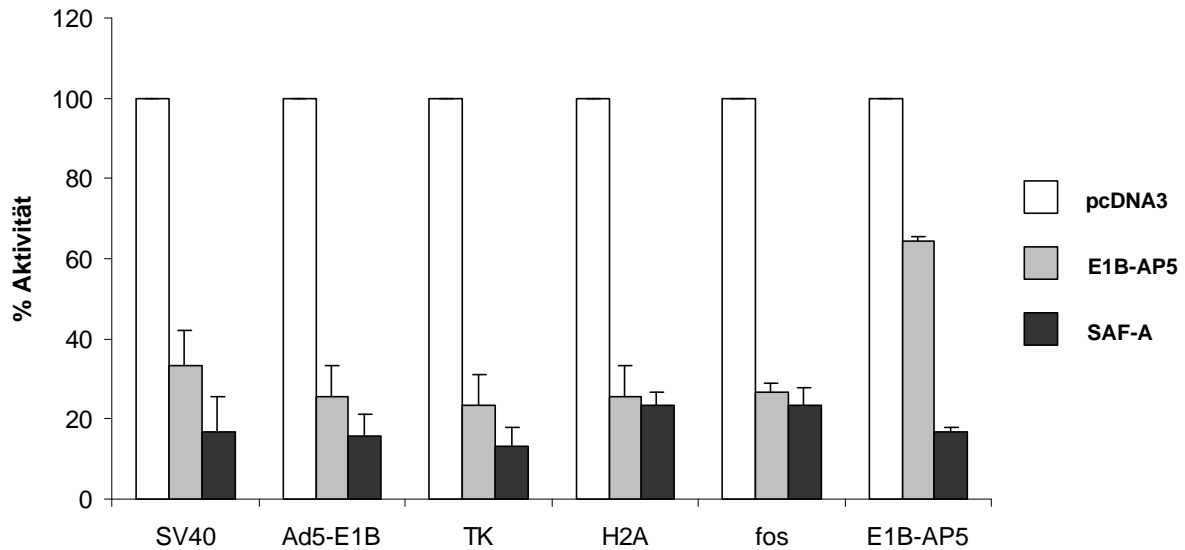


Abb. 7 Repression der basalen Aktivität verschiedener Promotoren durch das E1B-AP5-Protein

Es wurden je $2,5 \times 10^5$ H1299-Zellen in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen ausgesät und am nächsten Tag mit $0,3 \mu\text{g}$ der folgenden Reporterplasmide transfiziert (4.2.3.1): pGL2-control (*simian virus 40*-Promotor; SV40), pGL E1B-Luc (Ad5 E1B-Promotor; Ad5-E1B), pGL BL-Luc (Herpes Simplex-Virus Thymidin-Kinase-Promotor; TK), pXP 162 (Histon 2A-Promotor; H2A), pGL C3G1-Luc (*c-fos* Minimalpromotor; fos) und pGL2-AP5P/E (E1B-AP5 Promotor; E1B-AP5). Gleichzeitig wurden jeweils $0,1 \mu\text{g}$ des Kontrollplasmids pRL-CMV und $1,6 \mu\text{g}$ der Effektorplasmide pcDNA3, pHA-E1B-AP5wt oder pHA-SAF-A transfiziert (4.2.3.1). Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit Lysis-Puffer (Promega) lysiert und die Aktivität der Promotoren durch Messung der Luziferase-Menge luminometrisch bestimmt (*Dual-Luciferase Assay System*; Promega; 4.8). Die gemessene Luziferase-Menge in den Kontrollansätzen mit pcDNA3 wurde auf 100 % normiert und als Basis zur Berechnung der Effektorplasmid-vermittelten Promotoraktivität verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus zehn unabhängigen Versuchen.

erwartet eine Verringerung der basalen Aktivitäten auf weniger als 25 % verursachte. Interessanterweise zeigte das E1B-AP5-Protein eine vergleichbare Repression bezüglich der getesteten Promotoren, obwohl deren Restaktivität im Vergleich zu SAF-A stets etwas höher war. Den geringsten Einfluss hatte die transiente Überexpression des E1B-AP5-Genprodukts auf die Ausgangsaktivität des eigenen zellulären E1B-AP5-Promotors, bei dem eine Repression auf 64 % festgestellt wurde. Die stärkste E1B-AP5-vermittelte Repression wurde in Verbindung mit dem HSV-TK-Promotor beobachtet, dessen Aktivität auf 23 % des Referenzniveaus verringert wurde. Insgesamt zeigt dieses Ergebnis, dass das E1B-AP5-Protein einen zu SAF-A vergleichbaren repressorischen Einfluss auf die basale Aktivität verschiedener Promotoren ausübt.

5.1.1.2 Identifizierung der repressorischen Domäne des E1B-AP5-Proteins

Im nächsten Schritt sollte der für die Repression notwendige Bereich des E1B-AP5-Proteins bestimmt werden. Insbesondere die im carboxyterminalen Teil lokalisierten Funktionsdomänen waren dabei von Interesse (Abb. 8). Zum einen sollte der Einfluss der RGG-Domäne untersucht werden, welche zumindest *in vitro* Wechselwirkungen mit RNA eingehen kann (Gabler *et al.*, 1998) und posttranslational durch Methylierung modifiziert wird (Kzhyshkowska *et al.*, 2001), was auf eine Regulation der Funktion dieser Domäne schliessen läßt. Zum anderen war eine Polyprolin-Domäne von Interesse, da vergleichbare Regionen häufig Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln (Kay *et al.*, 2000) und damit eine Wechselwirkung mit Komponenten der basalen Transkription ermöglichen könnte.

Basierend auf dieser Grundlage wurden Deletionsmutanten der carboxyterminalen Domänen im E1B-AP5-Polypeptid auf Repression der SV40-, TK- und Ad5-E1B-Promotoren untersucht (Abb. 9). Es zeigte sich, dass die getesteten Deletionen keinen signifikanten Einfluss auf die Repression der basalen Promotoraktivität des SV40-Reporterplasmids hatten. Die Auswertung der Daten bezüglich der Repression der TK- und Ad5-E1B-Promotoren ergab, dass alle getesteten E1B-AP5-Deletionen zwar in der Lage waren die basale Transkription zu verringern, jedoch in ihrer Effizienz abhängig von der untersuchten Promotorregion variierten. Die Deletion der RGG-Domäne und des gesamten carboxyterminalen Bereichs zeigten in Verbindung mit

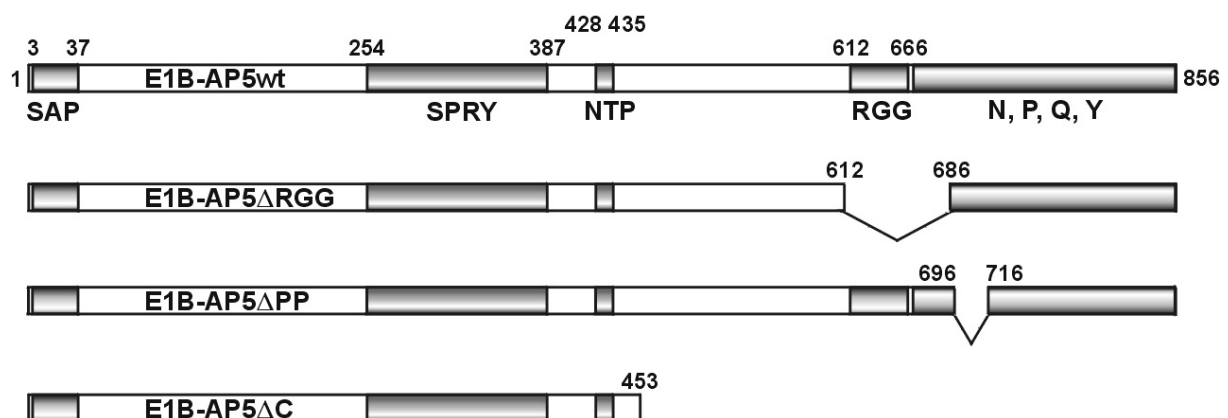


Abb. 8 Übersicht verwendeter Deletionsmutanten des E1B-AP5-Proteins

Dargestellt ist eine Übersicht der für die Kartierung der Repressionsdomäne verwendeten Deletionsmutanten des E1B-AP5-Polypeptids. Es wurden die Auswirkungen der Deletion der RGG- (AS 613-685), der Polyprolin-Domäne (AS 697-715) und des gesamten carboxyterminalen Bereichs auf die Repression basaler Promotoraktivität getestet.

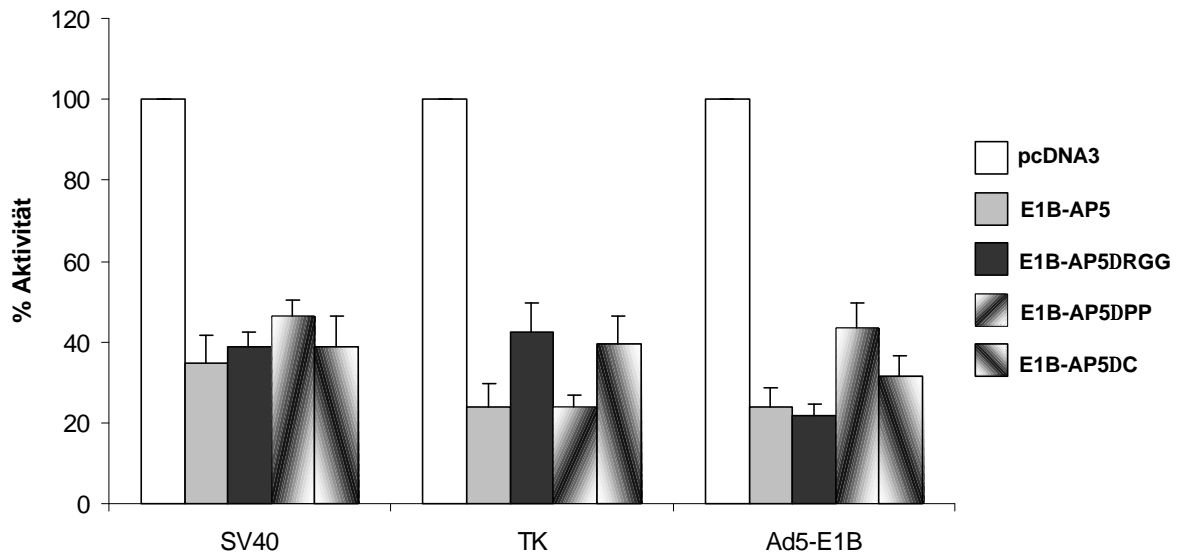


Abb. 9 Kartierung der repressorischen Domäne des E1B-AP5-Proteins

Es wurden je $2,5 \times 10^5$ H1299-Zellen in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen ausgesät und am nächsten Tag mit $0,3 \mu\text{g}$ der folgenden Reporterplasmide transfiziert (4.2.3): pGL2-control (*simian virus 40*-Promotor; SV40), pGL BL-Luc (Herpes Simplex-Virus Thymidin-Kinase-Promotor; TK), pGL E1B-Luc (Ad5 E1B-Promotor; Ad5-E1B). Gleichzeitig wurden jeweils $0,1 \mu\text{g}$ des Kontrollplasmids pRL-CMV und $1,6 \mu\text{g}$ der Effektorplasmide pcDNA3, pHA-E1B-AP5wt, pHA-E1B-AP5 Δ RGG, pHA-E1B-AP5 Δ PP oder pHA-E1B-AP5 Δ C transfiziert (4.2.3). Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit Lysis-Puffer (Promega) lysiert und die Aktivität der Promotoren durch Messung der Luziferase-Menge luminometrisch bestimmt (*Dual-Luciferase Assay System*; Promega; 4.8). Die gemessene Luziferase-Menge in den Kontrollansätzen mit pcDNA3 wurde auf 100 % normiert und als Basis zur Berechnung der Effektorplasmid-vermittelten Promotoraktivität verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus zehn unabhängigen Versuchen.

dem TK-Promotor im Vergleich zum Volllängenprotein mit 24 % der Ausgangsaktivität eine leicht verringerte Repression von 43 % bzw. 44 %. Im Gegensatz dazu war die Aktivität des Ad5 E1B-Promotors von diesen Deletionen kaum beeinflusst. In diesem Reportersystem wies jedoch die Deletion der Polyprolin-Domäne ein geringeres repressorisches Potenzial auf, wobei die Restaktivität des Reporterplasmids auf 44 % des Ausgangsniveaus verringert wurde.

Zusammenfassend lassen diese Daten darauf schließen, dass das E1B-AP5-Protein in der Lage ist die basale Transkription zu inhibieren. Die für die Repression verantwortliche Domäne ist vermutlich in der aminoterminalen Hälfte des Polypeptids lokalisiert, da dessen alleinige Expression die Aktivität der getesteten Promotoren verringerte. Zusätzliche regulatorische Effekte im carboxyterminalen Teil des Proteins könnten jedoch diese Funktion modulieren.

5.1.2 Modulation Glucocorticoid-regulierter Promotoraktivität durch E1B-AP5

Glucocorticoid-Rezeptoren gehören zur Familie der nukleären Steroidhormon-Rezeptoren, welche durch Interaktion mit spezifischen Liganden als Transkriptionsaktivatoren die Expression hormonregulierter Gene vermitteln (zur Übersicht: Mangelsdorf *et al.*, 1995). Dabei treten sie mit einer Vielzahl weiterer Kofaktoren in Wechselwirkung (zur Übersicht: Beato *et al.*, 1995). Aufgrund der Tatsache, dass Steroidhormon-Rezeptoren unter anderem in der nukleären Matrix lokalisiert sind (zur Übersicht: Barrack, 1987), führten Eggert und Mitarbeiter Untersuchungen von steroidhormonassoziierten Matrixproteinen durch. Dabei wurde das SAF-A-Polypeptid als Interaktionspartner des Glucocorticoid-Rezeptors identifiziert (Eggert *et al.*, 1997). Weiterführende Analysen ergaben, dass die transiente Überexpression von SAF-A mit der Glucocorticoid-vermittelten Transaktivierung von hormon-induzierbaren Reporter-gen-Plasmiden interferierte und deren Promotoraktivität stark reduzierte (Eggert *et al.*, 1997; Eggert *et al.*, 2001). Aufgrund der Beobachtung, dass das E1B-AP5-Protein einen zu SAF-A vergleichbaren Effekt auf die basale Promotoraktivität aufweist, war es von Interesse, ob E1B-AP5 ebenfalls die Aktivierung hormonregulierter Promotoren modulieren kann.

5.1.2.1 Einfluss von E1B-AP5 auf Glucocorticoid-vermittelte Transkription

Um den Einfluss des E1B-AP5-Proteins auf die Glucocorticoid-vermittelte Transkriptionsaktivierung zu untersuchen, wurden Luziferase-Versuche (4.8) mit einem Glucocorticoid-induzierbaren Reporter-gen-System durchgeführt. Dabei wird die Expression der Luziferase-cDNA durch die Promotorregion des *mouse mammary tumor virus* (MMTV) reguliert, welche vier *glucocorticoide responsive elements* (GRE) enthält. Durch Aktivierung von Glucocorticoid-Rezeptoren (GR) mit dem synthetischen Glucocorticoid-Analogon Dexamethason wird die Expression des Reporter-gens induziert.

Zur Untersuchung des Einflusses des E1B-AP5-Proteins auf die GR-vermittelte Aktivität des MMTV-Promotors im Vergleich zu SAF-A, wurden die transfizierten Zellen für 24 h vor Quantifizierung der Luziferase in Medium ohne Serum kultiviert (4.2.1.1) und gegebenenfalls durch Zusatz von Dexamethason (1×10^{-7} M; Sigma) die

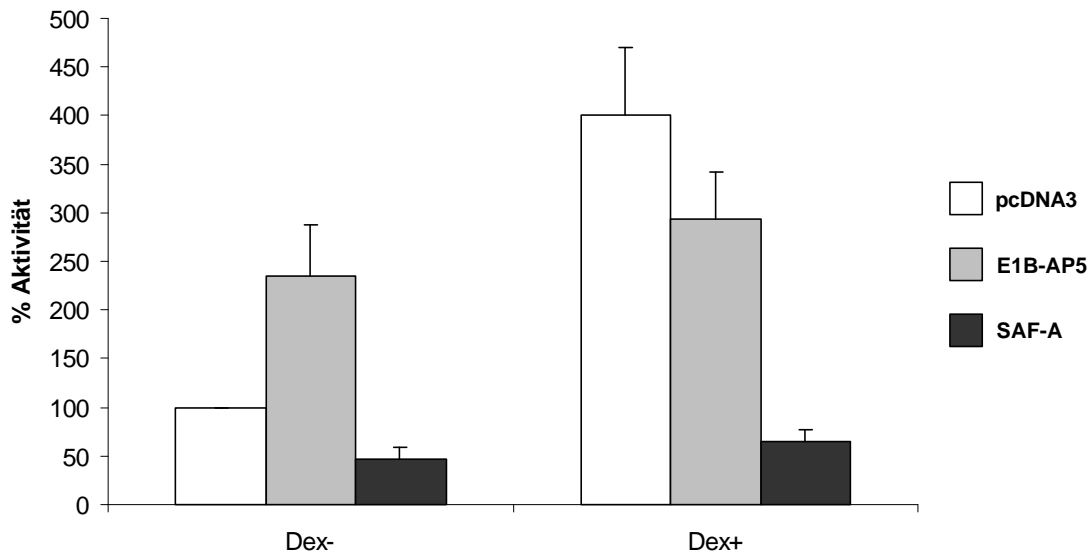


Abb. 10 Modulation der Glucocorticoid-vermittelten Transkriptionsregulation durch E1B-AP5

Es wurden je $2,5 \times 10^5$ H1299-Zellen in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen ausgesät und am nächsten Tag mit $0,3 \mu\text{g}$ des Reporterplasmids MMTV-Luc und $1,6 \mu\text{g}$ der Effektorplasmide pcDNA3, pHA-E1B-AP5wt, pHA-SAF-A zusammen mit $0,1 \mu\text{g}$ des Kontrollplasmids pRL-CMV transfiziert (4.2.3.1). Am darauf folgenden Tag wurde das Zellkulturmedium (4.2.1.1) entfernt und die Zellen in Medium ohne Serum, mit (Dex+) oder ohne (Dex-) Dexamethason ($1 \times 10^{-7} \text{ M}$) für 24 h weiterkultiviert. Die Aktivität des MMTV-Promotors wurde durch Messung der Luziferase-Menge luminometrisch bestimmt (*Dual-Luciferase Assay System*; Promega; 4.8). Die gemessene Luziferase-Menge im nicht induzierten Kontrollansatz mit pcDNA3 wurde auf 100 % normiert und als Basis zur Berechnung der Effektorplasmid-vermittelten Promotoraktivität verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus zehn unabhängigen Versuchen.

GR-vermittelte Transaktivierung induziert. Es zeigte sich (Abb. 10), dass ohne Zusatz von Dexamethason die transiente Überexpression des SAF-A-Genprodukts im Vergleich zur Referenzkontrolle (100 %) die Promotoraktivität auf 47 % reduzierte. Im Gegensatz dazu zeigte das E1B-AP5-Protein jedoch keine Repression, vielmehr wurde eine Steigerung der Luziferase-Syntheserate auf 235 % beobachtet. Durch Induktion mit Dexamethason wurde die Aktivität der Referenzkontrolle auf das Vierfache gesteigert. Die zusätzliche transiente Überexpression von SAF-A führte wiederum erwartungsgemäß zu einer Reduktion der Promotoraktivität auf 65 %. Dagegen zeigte das E1B-AP5-Protein nur einen geringen Einfluss auf die Dexamethason-induzierte MMTV-Promotoraktivität, die mit 294 % bestimmt wurde. Zusammenfassend deutet dieses Ergebnis auf unterschiedliche Funktionen des E1B-AP5- und SAF-A-Proteins in der Glucocorticoid-vermittelten Transkriptionsregulation hin.

5.1.2.2 Mutationsanalyse des regulatorischen Potenzials von E1B-AP5 auf GR-vermittelte Transkription

Um den Bereich im E1B-AP5-Polypeptid einzugrenzen, der für die Modulation der Glucocorticoid-Rezeptor-vermittelten Transkriptionsregulation notwendig ist, wurden Deletionsmutanten der RGG-Box, der Polyprolin-Domäne und der gesamten carboxyterminalen Hälfte von E1B-AP5 (Abb. 8; 5.1.1.2) im Luziferase-Versuch getestet. Die Auswertung der Daten (Abb. 11) des nicht induzierten MMTV-Reportersystems ergab, dass weder die Deletion der RGG-Box noch der Polyprolin-Domäne die Aktivierung durch E1B-AP5 beeinflusste. Beide Deletionsmutanten zeigten mit 247 % bzw. 259 % des Referenzniveaus eine vergleichbare Aktivierung wie das Volllängenprotein mit 235 %. Die Deletion der gesamten carboxyterminalen Domäne resultierte jedoch in einem Verlust der Modulation des nicht induzierten

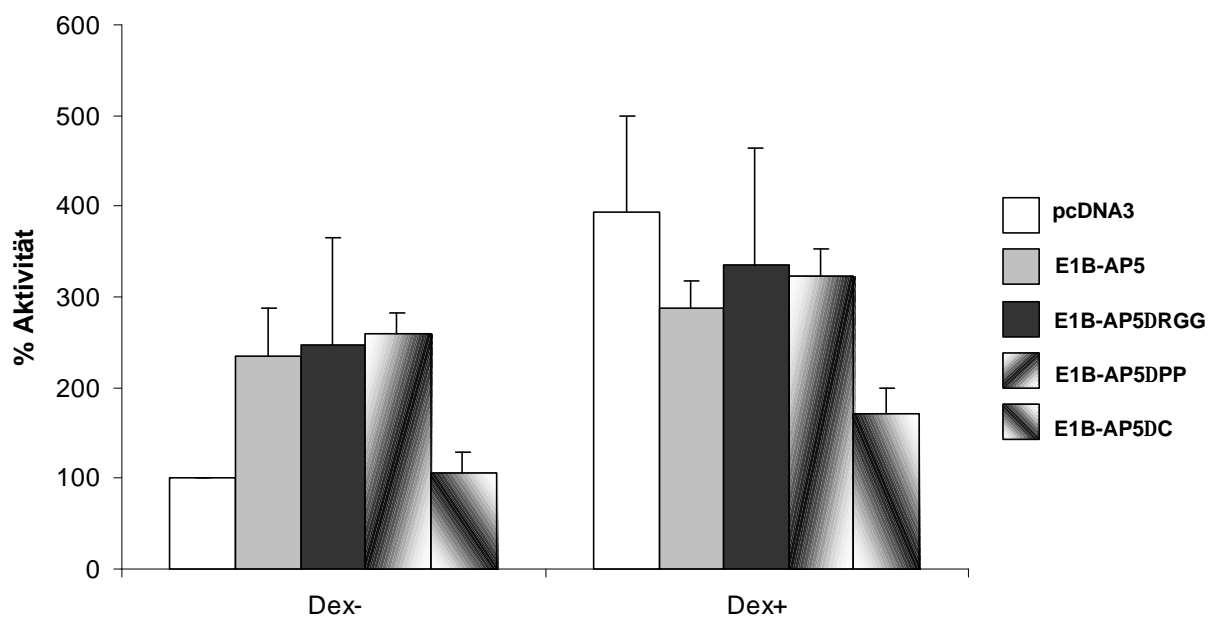


Abb. 11 Mutationsanalyse der Glucocorticoid-vermittelten Transkriptionsregulation

Es wurden je $2,5 \times 10^5$ H1299-Zellen in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen ausgesät und am nächsten Tag mit $0,3 \mu\text{g}$ des Reporterplasmids MMTV-Luc und $1,6 \mu\text{g}$ der Effektorplasmide pcDNA3, pHA-E1B-AP5wt, pHA-E1B-AP5ΔRGG, pHA-E1B-AP5ΔPP und pHA-E1B-AP5ΔC zusammen mit $0,1 \mu\text{g}$ des Kontrollplasmids pRL-CMV transfiziert (4.2.3.1). Am darauf folgenden Tag wurde das Zellkulturmedium (4.2.1.1) entfernt und die Zellen in Medium ohne Serum, mit (Dex+) oder ohne (Dex-) Dexamethason (1×10^{-7} M) für 24 h weiterkultiviert. Die Aktivität des MMTV-Promotors wurde durch Messung der Luziferase-Menge luminometrisch bestimmt (*Dual-Luciferase Assay System*; Promega; 4.8). Die gemessene Luziferase-Menge im nicht induzierten Kontrollansatz mit pcDNA3 wurde auf 100 % normiert und als Basis zur Berechnung der Effektorplasmid-vermittelten Promotoraktivität verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus zehn unabhängigen Versuchen.

MMTV-Promotors durch E1B-AP5. Ein vergleichbares Bild ergab sich bei der Analyse des Dexamethason-induzierten Reportersystems. Auch hier zeigten die Deletionen der RGG-Box oder der Polyprolin-Domäne keinen signifikanten Einfluss auf die Promotoraktivität mit 324 bzw. 335 % im Vergleich zum Volllängenprotein mit 288 %. Die gesamte Deletion des Carboxyterminus von E1B-AP5 resultierte jedoch in einer Repression des induzierten Promotorsystems, wobei die Aktivität auf 171 % sank.

Insgesamt zeigen die vorliegenden Daten, dass das E1B-AP5-Polypeptid nicht nur in der Lage ist Transkriptionsvorgänge zu inhibieren, sondern im promotorspezifischen Kontext der GR-vermittelten Transkriptionsregulation die Promotoraktivität zu transaktivieren. Außerdem lassen die Analysen der E1B-AP5-Deletionsmutanten den Schluss zu, dass die modulatorische Domäne im Bereich der Aminosäurereste 463-611 des E1B-AP5-Polypeptids lokalisiert ist. Diese Ergebnisse führten zu der Überlegung, dass ein bisher noch nicht identifiziertes Protein an der Aktivierung des MMTV-Promotors beteiligt ist und die Wechselwirkung mit diesem Faktor durch einen zentralen Bereich des E1B-AP5-Polypeptids vermittelt wird.

5.1.3 Identifizierung von BRD7 als E1B-AP5-assoziiertes Protein

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden mittels des *Yeast two-hybrid*-Systems nach E1B-AP5-interagierenden Proteinen gesucht. Dazu wurde eine cDNA-Genexpressions-Bibliothek aus HeLa-Zellen mit einem zentralen Polypeptid des E1B-AP5-Proteins (AS 213-732) durchmustert. Insgesamt wurden 16 unabhängige cDNAs isoliert, deren abgeleiteten Polypeptide spezifisch mit E1B-AP5 wechselwirkten. Interessanterweise waren acht der identifizierten cDNAs einem Transkript zugehörend, dessen Sequenz eine 82 %ige Übereinstimmung zur cDNA des *brd7*-Gens aus Maus (Synonym BP75; Cuppen *et al.*, 1999) aufwies. Die Volllängen-cDNA wurde isoliert (*accession number*: AJ271881) und mittels Sequenzanalysen näher untersucht. Es zeigte sich, dass ein bisher unbekanntes humanes Polypeptid mit 651 Aminosäuren abgeleitet werden kann, das ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 74 kDa besitzt. In Anlehnung an

die offizielle Nomenklatur des Maus-Homologs wurde die cDNA-Sequenz und das zugehörige Protein als BRD7 bezeichnet.

Der Vergleich der Primärstruktur des humanen *brd7*-Genprodukts mit dem bekannten Protein aus Maus ergab eine Identität der Aminosäuresequenz von 88 %, mit einer Homologie von 96 % (Abb. 12), was auf eine starke Konservierung der Polypeptide zwischen beiden Spezies hindeutet. Die Suche nach Funktionsdomänen ergab, dass das BRD7-Protein eine stark konservierte *bromo*-Domäne im aminoterminalen Teil des Polypeptids aufweist (AS 129-236). Interessanterweise sind viele Proteine, welche eine *bromo*-Domäne enthalten, als Kofaktoren an der

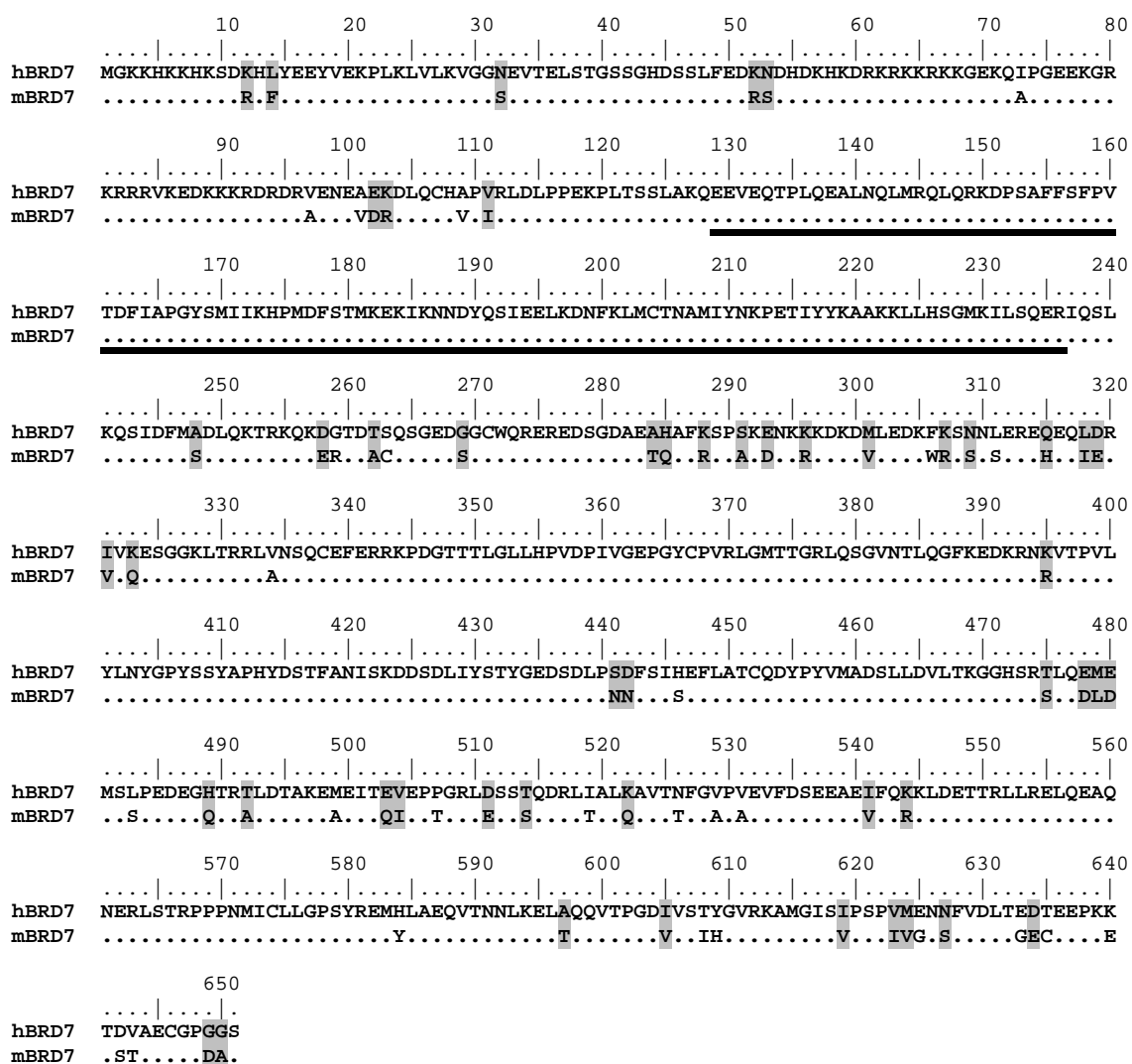


Abb. 12 Aminosäurevergleich der BRD7-Polypeptide aus Mensch und Maus

Dargestellt ist das *alignment* der BRD7-Proteine aus Mensch (hBRD7) und Maus (mBRD7). Es wurden nur die Abweichungen der Sequenz angegeben, wobei konservative Aminosäuresubstitutionen grau hinterlegt dargestellt sind. Die identifizierte *bromo*-Domäne ist durch Unterstreichung markiert.

Transkriptionsregulation beteiligt und stellen eine Verbindung zur Chromatinstruktur her (zur Übersicht: Dyson *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang war es von besonderem Interesse, ob die Wechselwirkung zwischen E1B-AP5 und BRD7 zur Transkriptionsregulation beiträgt.

5.1.3.1 Herstellung eines GST-BRD7-Fusionsproteins

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen E1B-AP5 und BRD7 wurde ein GST-Fusionsprotein von BRD7 mittels des *GST Gene Fusion Systems* (4.6.3; Amersham) hergestellt. Für die Fusion und Aufreinigung des Vollängenproteins wurde die kodierende Sequenz des BRD7-Polypeptids mittels PCR (4.4.5) unter Verwendung des Plasmids pSport-Brm als Matrizen-DNA und der Oligonukleotide GST-BRD7forw und BRD7rev amplifiziert. Nach Spaltung des resultierenden PCR-Produkts und des Klonierungsvektors pGEX4T-1 mit den Restriktionsendonukleasen *Sma*I und *Xho*I (4.4.6.1) wurde die kodierende Sequenz von BRD7 in den Leserahmen des GST-tags ligiert (4.4.6.2) und elektrokompetente *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL transformiert (4.1.2). Schließlich erfolgte die Expression und Aufreinigung des GST-Fusionsproteins (4.6.3).

5.1.3.2 Herstellung von E1B-AP5-Deletionsmutanten

Aufgrund der Beobachtung, dass das modulatorische Potenzial der GR-vermittelten Transkriptionsregulation von E1B-AP5 im Bereich der Aminosäuren 453-611 lokalisiert ist, wurden Deletionsmutanten dieser Region erzeugt. Basierend auf der Methode der *overlap extension* (Abb. 13; Ho *et al.*, 1989) wurden Zweistufen-PCR-Reaktionen durchgeführt, die in internen Deletionen innerhalb der kodierenden Sequenz von E1B-AP5 resultierten. Zur Herstellung der Deletionsmutante E1B-AP5 Δ BBS1 (BRD7 *binding site*; Deletion der AS 457-496) wurden zunächst die flankierenden Sequenzanteile der einzufügenden Deletion in zwei getrennten PCR-Reaktionen mit den Oligonukleotiden pcDNA3forw und E1B-AP5 Δ BBS1A sowie E1B-AP5 Δ BBS1B und pcDNA3rev amplifiziert (4.4.5). Die resultierenden Produkte wurden 100fach verdünnt, gemischt und zusammen in eine zweite PCR-

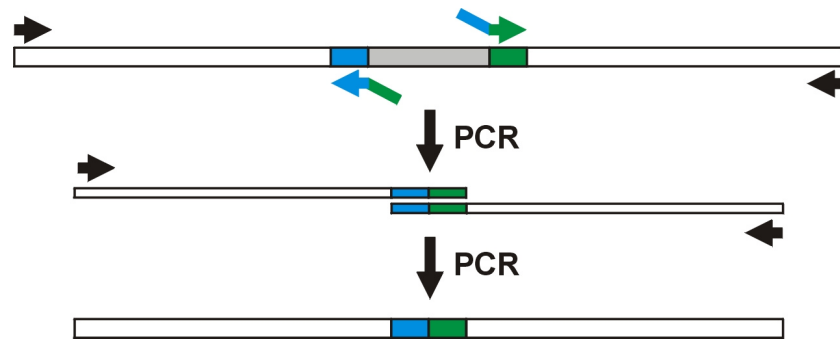


Abb. 13 Prinzip der Deletion interner Sequenzen durch *overlap extension*

Das Funktionsprinzip der *overlap extension* (Ho *et al.*, 1989) beruht auf einer Zweistufen-PCR-Amplifikation. In einem ersten Reaktionsansatz werden die flankierenden Sequenzanteile des zu deletierenden Bereichs (graue Box) getrennt mit partiell überlappenden (blau und grün markiert) und zusätzlichen 5' und 3' Oligonukleotiden (schwarz) amplifiziert. Die Produkte werden gemischt und mit 5' und 3' Oligonukleotiden (schwarz) erneut *in vitro* vermehrt. Das resultierende Produkt enthält die gewünschte Deletion.

Amplifikation mit den Oligonukleotiden pcDNA3forw und pcDNA3rev eingesetzt. Das entstandene Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Eco* RI und *Xho* I behandelt und in den ebenfalls gespaltenen Vektor pcDNA3 kloniert (4.4.6). Analog erfolgte die Herstellung der Deletionsmutante E1B-AP5 Δ BBS2 (Deletion der AS 457-593) mit den Oligonukleotiden E1B-AP5 Δ BBS2A, E1B-AP5 Δ BBS2B, pcDNA3forw und pcDNA3rev. Die Klonierung der Interaktionsdomäne E1B-AP5BBS erfolgte nach PCR-Amplifikation der kodierenden Sequenz mit den Oligonukleotiden E1B-AP5BBSforw und E1B-AP5BBSrev und dem Plasmid pHA-E1B-AP5 als Matrize (4.4.5). Das resultierende Produkt sowie das Ausgangsplasmid pHA-E1B-AP5 wurde mit dem Restriktionsenzym *Xho* I gespalten und die Sequenz der BBS-Region nach Aufreinigung in das Plasmidrückgrat ligiert (4.4.6). Elektrokompente *E. coli* DH 10B wurden schließlich mit den Ligationsansätzen transformiert (4.1.2) und die rekombinanten Plasmide isoliert (4.4.1.1). Die radioaktive Markierung der E1B-AP5-Polypeptide wurde mittels des *TNT T7-coupled Reticulocyte-Lysate System* (Promega) unter der Verwendung der entsprechenden Plasmide durchgeführt (4.6.5).

5.1.3.3 *In-vitro-Wechselwirkung von E1B-AP5 mit GST-BRD7*

Zur Analyse der E1B-AP5-BRD7-Wechselwirkung wurde ein GST-Pulldown-Versuch (4.6.9; Kaelin *et al.*, 1991) durchgeführt. Dazu wurde an Glutathion-Sepharose gebundenes GST-BRD7-Fusionsprotein mit verschiedenen, radioaktiv markierten (4.6.5) E1B-AP5-Polypeptiden (Abb. 14) inkubiert. Parallel wurde als Kontrolle das GST-Protein ohne Fusionsanteil verwendet.

Die Auswertung der Daten ergab (Abb. 15), dass das Volllängenprotein von E1B-AP5 mit GST-BRD7 kosedimentiert wurde, wodurch eine direkte Wechselwirkung beider Proteine bestätigt wurde. Die Deletion der gesamten carboxyterminalen Region (E1B-AP5 Δ C) führte zur Aufhebung dieser Interaktion. Die beiden Deletionen innerhalb der Domäne des E1B-AP5-Proteins, welche für die Modulation der GR-vermittelten Transkriptionsregulation verantwortlich ist, führten zu einer deutlichen Verringerung (E1B-AP5 Δ BBS1) oder zu einem fast vollständigen Verlust (E1B-AP5 Δ BBS2) der Interaktion von E1B-AP5 mit BRD7. Umgekehrt zeigte diese E1B-AP5-Domäne (E1B-AP5BBS) eine starke Wechselwirkung mit dem BRD7-Polypeptid. Keines der Polypeptide wurde in der Kontrolle mit dem GST-Protein kosedimentiert, was die Spezifität der Wechselwirkung unterstreicht. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass das E1B-AP5-Protein mit BRD7 interagieren kann und eine zentrale

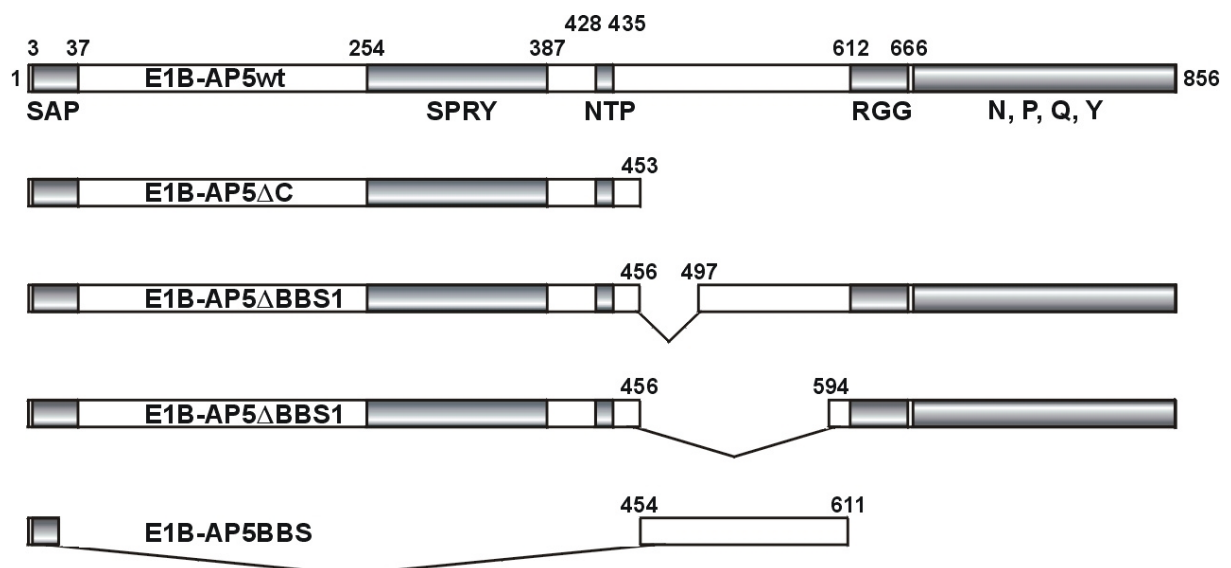


Abb. 14 Schematische Übersicht verwendeter E1B-AP5-Fragmente

Dargestellt sind die verwendeten E1B-AP5-Fragmente, die für In-vitro-Bindungsstudien mit GST-BRD7 verwendet wurden.

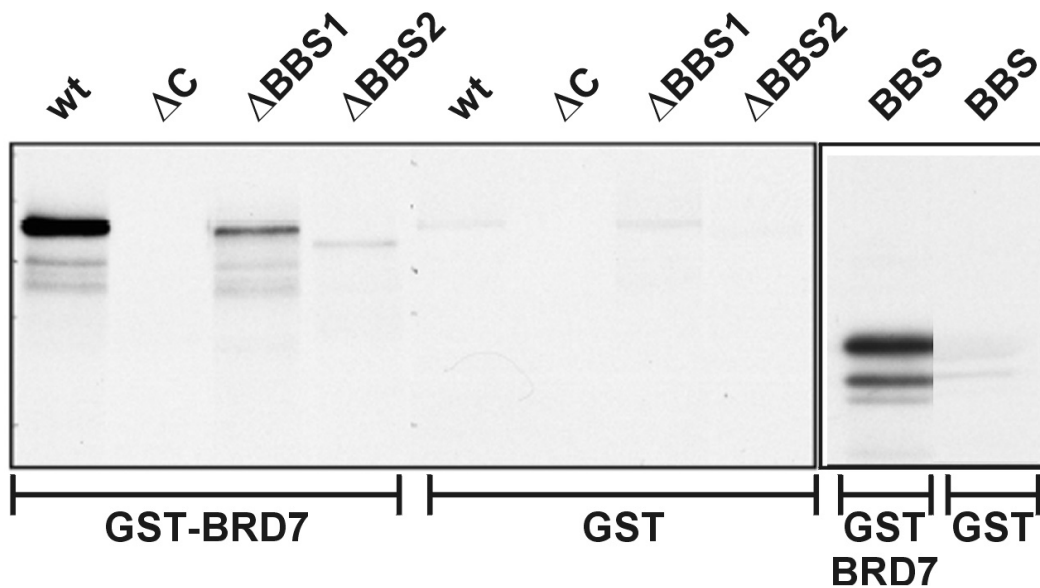


Abb. 15 In-vitro-Bindungsstudie zur Interaktion von E1B-AP5 mit BRD7

Das GST-BRD7-Fusionsprotein wurde mit *in vitro* translatierten, radioaktiv markierten E1B-AP5-Polypeptiden (4.6.5) inkubiert, mehrmals stringent gewaschen (DA 500; 4.6.9) und über 12 %ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt. Zur Verstärkung der radioaktiven Signale wurde das Gel in *Enlight* (EnerGene) inkubiert und vakuumgetrocknet. Gebundene Proteine wurden mittels Autoradiografie detektiert. Zur Kontrolle wurde GST ohne Fusionsanteil mit den E1B-AP5-Polypeptiden inkubiert.

Domäne des E1B-AP5-Polypeptids, welche die Aminosäuren 454-611 umfasst, die Wechselwirkung mit dem BRD7-Protein vermittelt. Interessanterweise stimmt diese Region mit der modulatorischen Funktionsdomäne von E1B-AP5 überein, die für die Transaktivierung des MMTV-Promotors verantwortlich ist.

5.1.3.4 *In-vitro*-Wechselwirkung von BRD7 mit GST-E1B-AP5

Um der Frage nachzugehen, ob die im BRD7-Protein identifizierte *bromo*-Domäne die Wechselwirkung mit E1B-AP5 vermittelt, wurden GST-*Pulldown*-Versuche mit einem GST-E1B-AP5-Fusionsprotein und *in vitro* translatierten BRD7-Polypeptiden durchgeführt. Dabei sollte die Bindung sowohl des Volllängenproteins als auch der Einfluss einer Deletion der *bromo*-Domäne von BRD7 untersucht werden. Zunächst wurde der Leserahmen des *brd7*-Genprodukts durch PCR aus dem Plasmid pSport-Brm als Matrize und unter Verwendung der Oligonukleotide BRD7forw und BRD7rev amplifiziert (4.4.5). Das resultierende Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Kpn*I und *Xho*I gespalten und aufgereinigt (4.4.6.1). Parallel wurde die Expressionskassette für das FLAG-Epitop (erlaubt den immun-

zytochemischen Nachweis) mit den Restriktionsenzymen *Hin* DIII und *Kpn* I, sowie der Klonierungsvektor pcDNA3 mit den Enzymen *Hin* DIII und *Xho* I gespalten und aufgereinigt (4.4.6.1). Die BRD7-Sequenz wurde gleichzeitig zusammen mit der FLAG-Expressionskassette in den vorbereiteten Vektor ligiert (4.4.6.2) und es wurden *E. coli* DH 10B mit dem Ligationsansatz transformiert (4.1.2). Die Deletion der *bromo*-Domäne innerhalb des Leserahmens von BRD7 wurde nach der beschriebenen *overlap extension*-Methode (5.1.3.2) mit den Oligonukleotiden pcDNA3forw, pcDNA3rev, BRD7 Δ BD-A und BRD7 Δ BD-B durchgeführt und analog kloniert.

Das aufgereinigte GST-E1B-AP5-Fusionsprotein (4.6.3) wurde zusammen mit den *in vitro* translatierten BRD7-Polypeptiden (4.6.5) inkubiert und die Wechselwirkung mittels GST-Pulldown-Versuche (4.6.9) analysiert. Es zeigte sich (Abb. 16), dass sowohl das Volllängenprotein als auch die Deletionsmutante (BRD7 Δ BD-1) der *bromo*-Domäne in der Lage waren, mit dem GST-E1B-AP5-Fusionsprotein zu interagieren. Die Kontrolle mit GST ohne Fusionsanteil zeigte keine unspezifische Bindung der BRD7-Polypeptide. Das bedeutet, dass für die Wechselwirkung von

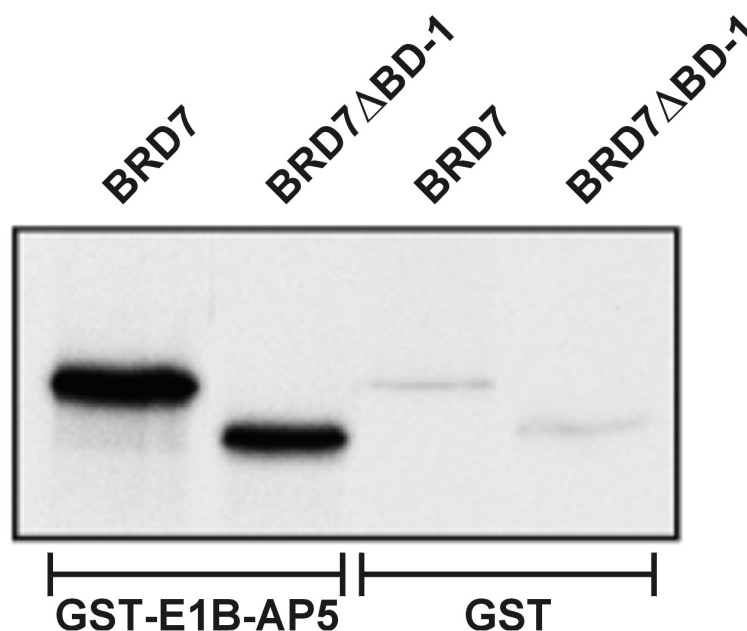


Abb. 16 In-vitro-Bindungsstudie zur Funktion der *bromo*-Domäne im BRD7-Protein

Das GST-E1B-AP5-Fusionsprotein wurde mit *in vitro* translatierten, radioaktiv markierten BRD7-Polypeptiden (4.6.5) inkubiert, mehrmals stringent gewaschen (DA 500; 4.6.9) und über 12 %ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt. Zur Verstärkung der radioaktiven Signale wurde das Gel in *Enlight* (EnerGene) inkubiert und vakuumgetrocknet. Gebundene Proteine wurden mittels Autoradiografie detektiert. Zur Kontrolle wurde GST ohne Fusionsanteil mit den BRD7-Polypeptiden inkubiert.

E1B-AP5 mit dem *brd7*-Genprodukt die *bromo*-Domäne von BRD7 nicht notwendig ist.

5.1.4 In-vitro-Untersuchungen zur Wechselwirkung des BRD7-Proteins mit Histonen

Die in der aminoterminalen Region des BRD7-Proteins (AS 129-236) lokalisierte *bromo*-Domäne kann in vielen chromatinassoziierten Polypeptiden und in fast allen nukleären Histon-Acetyltransferasen identifiziert werden (Jeanmougin *et al.*, 1997). Neuere Untersuchungen zeigen, dass *bromo*-Domänen Wechselwirkungen mit acetylierten Histonproteinen vermitteln (zur Übersicht: Zeng und Zhou, 2002) und damit eine Verbindung zwischen Chromatinstruktur und Transkriptionsregulation schaffen (zur Übersicht: Dyson *et al.*, 2001). Basierend auf dieser Grundlage war es von Interesse, ob das BRD7-Polypeptid ebenfalls mit Histonproteinen wechselwirken kann.

Für die In-vitro-Untersuchung der Wechselwirkung von Histonen mit dem *brd7*-Genprodukt wurde sowohl das Volllängenprotein als auch eine aminoterminaler Deletionsmutante (Δ AS 1-375) als GST-Fusionsprotein exprimiert. Zur Durchführung der Deletion wurde die kodierende Sequenz von BRD7 mit dem Plasmid pSport-Brm als Matrize mit den Oligonukleotiden BRD7-D1forw und BRD7rev amplifiziert (4.4.5), mit den Restriktionsenzymen *Bam* HI und *Xho* I gespalten (4.4.6.1) und in den mit *Bam* HI und *Xho* I gespaltenen Vektor pGEX4T-1 ligiert (4.4.6.2). Mit dem Ligationsansatz wurden im Anschluss *E. coli* BL21-CodonPlus-RIL transformiert (4.1.2). Schließlich erfolgte die Expression und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine (4.6.3). Parallel wurden die Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 mittels des *TNT T7-coupled Reticulocyte-Lysate System* (Promega) radioaktiv markiert (4.6.5) und anschließend in den GST-Pulldown-Versuchen mit den BRD7-Fusionsproteinen eingesetzt (4.6.9). Es zeigte sich (Abb. 17), dass alle getesteten Histone mit dem Volllängenprotein von BRD7 (GST-BRD7) kosedimentiert werden konnten, wobei kein signifikanter Unterschied der Affinität des *brd7*-Genprodukts zu den unterschiedlichen Histonen festgestellt wurde. Die Deletion der aminoterminalen Region des BRD7-Polypeptids (GST-BRD7 Δ BD2), welche die kartierte *bromo*-Domäne

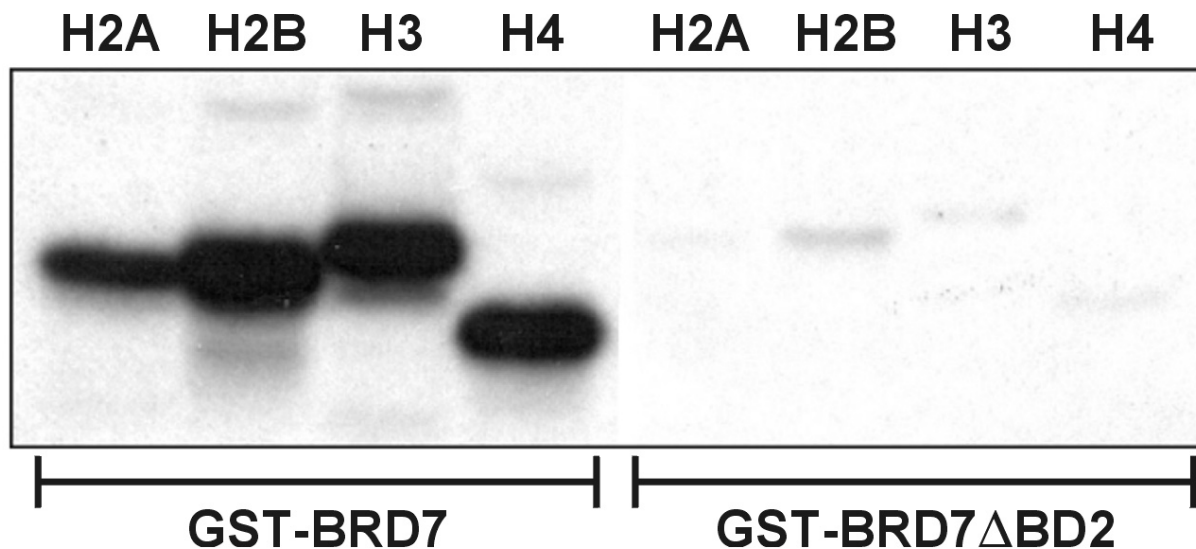


Abb. 17 In-vitro-Bindungsstudie zur Interaktion von BRD7 mit Histonproteinen

Die GST-BRD7-Fusionsproteine wurden mit *in vitro* translatierten, radioaktiv markierten Histonproteinen H2A, H2B, H3 und H4 (4.6.5) inkubiert, mehrmals stringent gewaschen (DA 500; 4.6.9) und kosedimentierte Proteine über 12%ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt. Zur Verstärkung der radioaktiven Signale wurde das Gel in *Enlight* (EnerGene) inkubiert und vakuumgetrocknet. Gebundene Proteine wurden mittels Autoradiografie detektiert.

mit einschloss, führte jedoch zu einer vollständigen Aufhebung der Histon-BRD7-Wechselwirkung. Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass das BRD7-Protein zumindest *in vitro* mit den Histonproteinen H2A, H2B, H3 und H4 wechselwirkt und diese Interaktion über die aminoterminal gelegene *bromo*-Domäne vermittelt wird.

5.1.4.1 Einfluss von E1B-AP5 auf die BRD7-Histon-Wechselwirkung

Basierend auf den Beobachtungen, dass sowohl das E1B-AP5-Polypeptid als auch Histonproteine mit dem *brd7*-Genprodukt interagieren können, stellte sich die Frage, ob diese Wechselwirkung durch Konkurrenz der BRD7-Bindungspartner moduliert wird. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde basierend auf GST-Pulldown-Versuchen (4.6.9) ein Konkurrenzexperiment durchgeführt. Das GST-BRD7-Fusionsprotein wurde mit einer gleichbleibenden Menge Histon H3-Protein und einer steigenden Konzentration von E1B-AP5 im Versuchsansatz, beide radioaktiv markiert (4.6.5), inkubiert und kosedimentierte Polypeptide identifiziert. Die Auswertung ergab (Abb. 18), dass die Interaktion des Histon H3-Proteins durch Zusatz des E1B-AP5-Polypeptids nicht beeinflusst wird. Selbst ein achtfacher

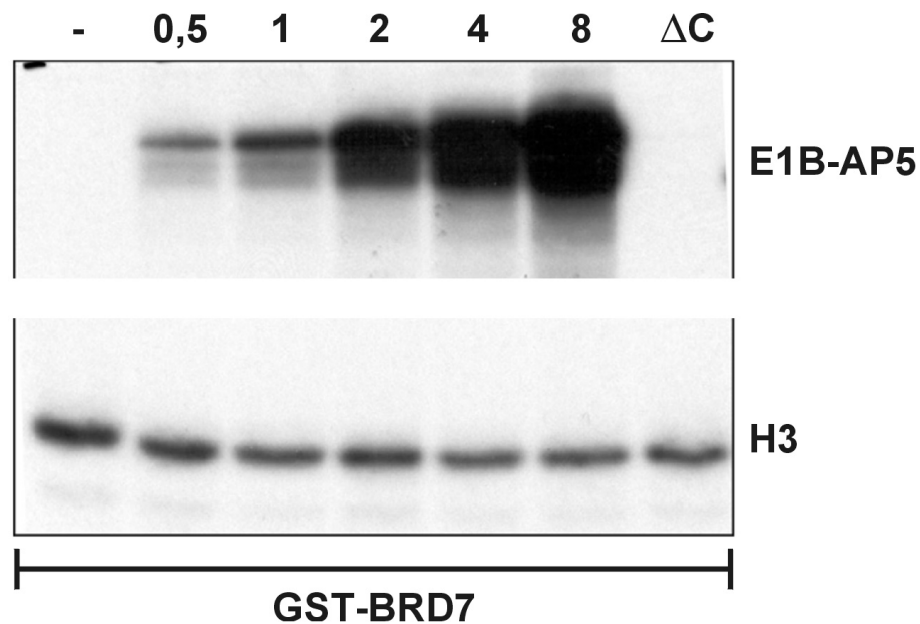


Abb. 18 Kompetitions-GST-Pulldown von E1B-AP5 und Histon H3

Das GST-BRD7-Fusionsprotein wurde mit *in vitro* translatiertem, radioaktiv markiertem Histonprotein H3 und unterschiedlichen Mengen an E1B-AP5 (4.6.5) inkubiert, mehrmals stringent gewaschen (DA 500; 4.6.9) und kosedimentierte Proteine über 12 %ige SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Zur Verstärkung der radioaktiven Signale wurde das Gel in *Enlight* (EnerGene) inkubiert und vakuumgetrocknet. Gebundene Proteine wurden mittels Autoradiografie detektiert. Die Zahlen geben die Menge des eingesetzten E1B-AP5-Polypeptids als Vielfaches der Histonprotein-Menge an. Es wurde je eine Negativkontrolle ohne E1B-AP5-Protein (-) und einer carboxyterminalen Deletionsmutante (ΔC) durchgeführt.

Überschuss von E1B-AP5 im Versuchsansatz veränderte nicht die Menge an gebundenem Histon H3. Umgekehrt wurden selbst geringe Mengen von E1B-AP5 zusammen mit dem GST-BRD7/H3-Komplex kosedimentiert. Die Verwendung der carboxyterminalen Deletionsmutante E1B-AP5 ΔC (ΔAS 454-856) als Negativkontrolle zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die Histon H3-Bindung. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass das E1B-AP5-Polypeptid zusammen mit Histon-Proteinen einen trimeren Komplex mit dem *brd7*-Genprodukt ausbilden kann. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die BRD7-Interaktionspartner über unterschiedliche Regionen mit dem BRD7-Protein in Wechselwirkung treten.

5.1.5 BRD7 als Kofaktor der E1B-AP5-vermittelten Transkriptionsregulation

Schließlich war es von Interesse, inwieweit die Wechselwirkung von BRD7 mit E1B-AP5 dessen modulatorische Eigenschaften in der Transkriptionsregulation

beeinflusst. Dazu wurden Luziferase-Versuche mit Deletionsmutanten der BRD7-Interaktionsdomäne von E1B-AP5 durchgeführt.

Zunächst wurden die Deletionsmutanten E1B-AP5 Δ BBS1 und E1B-AP5 Δ BBS2 zusammen mit dem Volllängenprotein im Kontext der basalen Aktivität der SV40-, TK- und Ad5-E1B-Promotoren untersucht (Abb. 19). Es zeigte sich, dass die transiente Überexpression beider Deletionsmutanten im Vergleich zum Volllängenprotein zu einer zwei- bis fünffach verstärkten Repression aller Promotoren führte. Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass das *brd7*-Genprodukt die repressorische Aktivität von E1B-AP5 auf die basale Transkription moduliert, indem es der E1B-AP5-vermittelten Transkriptionshemmung entgegenwirkt. Durch die Aufhebung der Wechselwirkung von BRD7 mit E1B-AP5 wird dessen repressorische Funktion enorm verstärkt.

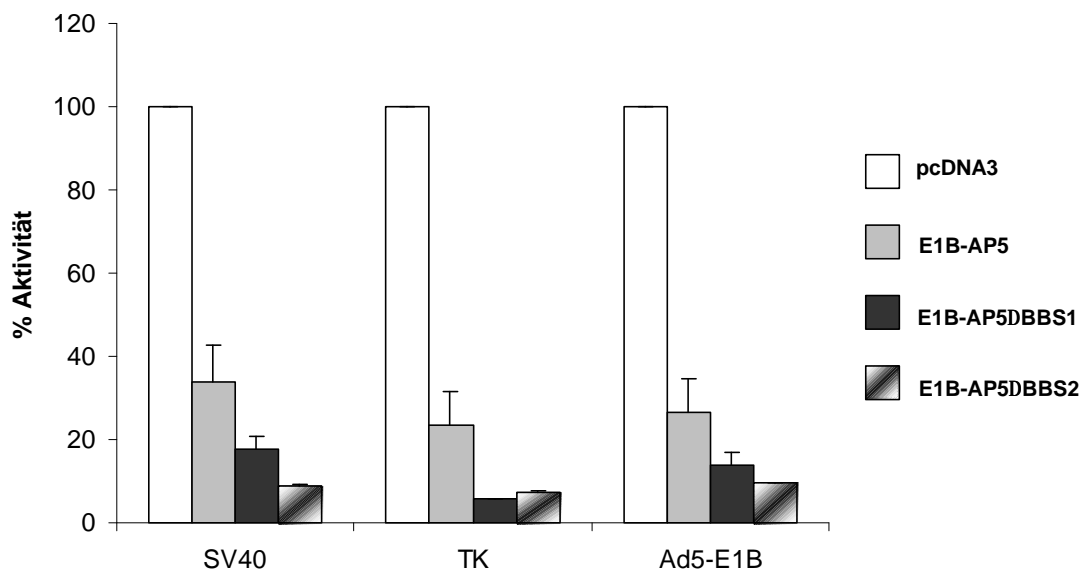


Abb. 19 Einfluss der BRD7-Interaktion von E1B-AP5 auf die basale Promotoraktivität

Es wurden je $2,5 \times 10^5$ H1299-Zellen in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen ausgesät und am nächsten Tag mit $0,3 \mu\text{g}$ der folgenden Reporterplasmide transfiziert (4.2.3.1): pGL2-control (*simian virus 40*-Promotor; SV40), pGL BL-Luc (Herpes Simplex-Virus Thymidin-Kinase-Promotor; TK), pGL E1B-Luc (Ad5 E1B-Promotor; Ad5-E1B). Gleichzeitig wurden jeweils $0,1 \mu\text{g}$ des Kontrollplasmids pRL-CMV und $1,6 \mu\text{g}$ der Effektorplasmide pcDNA3, pHA-E1B-AP5wt, pHA-E1B-AP5 Δ BBS1 oder pHA-E1B-AP5 Δ BBS2 transfiziert (4.2.3.1). Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit Lysis-Puffer (Promega) lysiert und die Aktivität der Promotoren durch Messung der Luziferase-Menge luminometrisch bestimmt (*Dual-Luciferase Assay System*; Promega; 4.8). Die gemessene Luziferase-Menge in den Kontrollansätzen mit pcDNA3 wurde auf 100 % normiert und als Basis zur Berechnung der Effektorplasmid-vermittelten Promotoraktivität verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus zehn unabhängigen Versuchen.

Unterstützt wird diese Hypothese durch Ergebnisse analoger Luziferase-Versuche mit den E1B-AP5-Deletionsmutanten im Kontext der Glucocorticoid-vermittelten Transkriptionsregulation (Abb. 20). Während das Volllängenprotein in der Lage war die nicht induzierte Aktivität des MMTV-Promotors auf 233 % erhöhen, zeigte die Überexpression beider Deletionsmutanten der BRD7-Interaktionsdomäne im E1B-AP5-Polypeptid nicht nur eine Aufhebung der Transaktivierung, sondern überraschenderweise eine starke Repression. Im Vergleich zum Volllängenprotein wurde die Aktivität des MMTV-Promotors auf mehr als ein Zwanzigstel reduziert. Die Dexamethason-induzierte, GR-vermittelte Transaktivierung des MMTV-Promotors ergab ein vergleichbares Resultat. Während die transiente Überexpression des Volllängenproteins kaum in der Lage war, die Aktivität zu beeinflussen, zeigten die E1B-AP5 Δ BBS1- und E1B-AP5 Δ BBS2-Deletionsmutanten erneut eine starke Repression der Promotoraktivität.

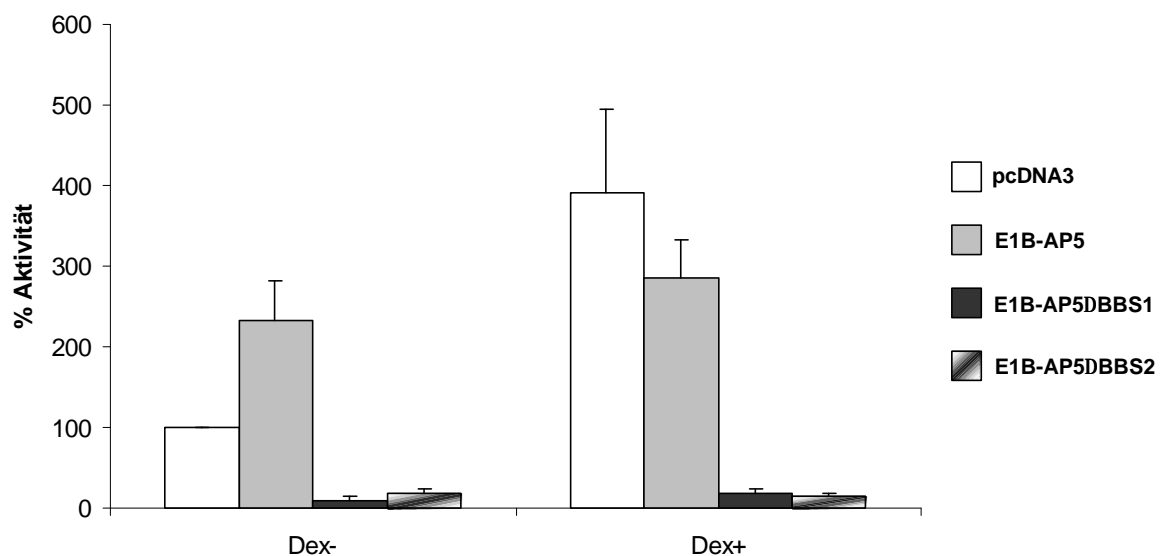


Abb. 20 Einfluss der BRD7-Interaktion auf die GR-vermittelte Promotoraktivität von E1B-AP5

Es wurden je $2,5 \times 10^5$ H1299-Zellen in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen ausgesät und am nächsten Tag mit $0,3 \mu\text{g}$ des Reporterplasmids MMTV-Luc und $1,6 \mu\text{g}$ der Effektorplasmide pcDNA3, pHA-E1B-AP5wt, pHA-E1B-AP5 Δ BBS1 und pHA-E1B-AP5 Δ BBS2 zusammen mit $0,1 \mu\text{g}$ des Kontrollplasmids pRL-CMV transfiziert (4.2.3.1). Am darauf folgenden Tag wurde das Zellkulturmedium (4.2.1.1) entfernt und die Zellen in Medium ohne Serum, mit (Dex+) oder ohne (Dex-) Dexamethason (1×10^{-7} M, Sigma), für 24 h weiterkultiviert. Die Aktivität des MMTV-Promotors wurde durch Messung der Luziferase-Menge luminometrisch bestimmt (*Dual-Luciferase Assay System*; Promega; 4.8). Die gemessene Luziferase-Menge im nicht induzierten Kontrollansatz mit pcDNA3 wurde auf 100 % normiert und als Basis zur Berechnung der Effektorplasmid-vermittelten Promotoraktivität verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus zehn unabhängigen Versuchen.

Insgesamt deuten die vorliegenden Daten darauf hin, dass das E1B-AP5-Protein als Kofaktor der Transkriptionsregulation die Aktivität verschiedener Promotoren beeinflusst. Dabei werden von E1B-AP5 sowohl transreprimierende als auch transaktivierende Funktionen vermittelt, welche durch regulatorische Signale des BRD7-Proteins, einem neuem Interaktionspartner von E1B-AP5, moduliert werden.

5.1.6 In-Vitro-Untersuchungen zur Wechselwirkung von E1B-AP5 mit p300

Zusätzlich zur Regulation der Genexpression durch Wechselwirkung spezifischer Faktoren mit der basalen Transkriptionsmaschinerie, vermittelt die Organisation chromosomaler DNA in geordnete Chromatinstrukturen zusätzliche modulatorische Signale. Dabei spielt die Komplexierung genomischer DNA mit Histonproteinen eine wichtige Rolle, die im Zuge der Initiation der Transkription durch reversible Acetylierung spezifischer Lysinreste reguliert wird (zur Übersicht: Struhl, 1998). Zusätzlich beeinflussen spezifische Kernstrukturen, die sogenannte nukleäre Matrix, viele Aspekte nukleärer Vorgänge wie DNA-Replikation, RNA-Prozessierung und Transkriptionsregulation (zur Übersicht: Nickerson *et al.*, 1995). Durch die Interaktion spezifischer AT-reicher Sequenzen chromosomaler DNA, sogenannte *matrix associated regions* (MARs) oder *scaffold-attachment regions* (SARs), mit Proteinkomponenten der nukleären Matrix (Cockerill und Garrard, 1986), wird eine hochgeordnete Organisation chromosomaler DNA im Zellkern ermöglicht. Die molekularen Mechanismen der Einflussnahme matrixassoziierter Proteine auf die Transkriptionsregulation waren bisher jedoch unklar. Basierend auf der Grundlage, dass das SAF-A-Polypeptid ein Hauptbestandteil der nukleären Matrix ist, führten Martens und Mitarbeiter Untersuchungen zur Identifizierung SAF-A-assoziierter Proteine durch, die in Verbindung zur Transkriptionsregulation stehen (Martens *et al.*, 2002). Dabei wurde das p300-Protein identifiziert, welches durch die Wechselwirkung mit SAF-A eine Verbindung der nukleären Matrix zur Transkriptionsregulation über die reversible Acetylierung von Histonproteinen schafft.

Aufgrund der hochkonservierten aminoterminalen SAP-Homologiedomäne im E1B-AP5-Polypeptid, die auf eine Wechselwirkung mit S/MARs chromosomaler DNA schliessen lässt, stellte sich die Frage ob E1B-AP5 analog zum homologen SAF-A-Protein mit einer carboxyterminalen Domäne von p300 interagieren kann. Basierend auf dieser Überlegung wurden In-vitro-Bindungsstudien mit GST-Fusionen definierter carboxyterminaler p300-Fragmente und verschiedenen *in vitro* translatierten (4.6.9) E1B-AP5-Deletionsmutanten (Abb. 8) durchgeführt. Die

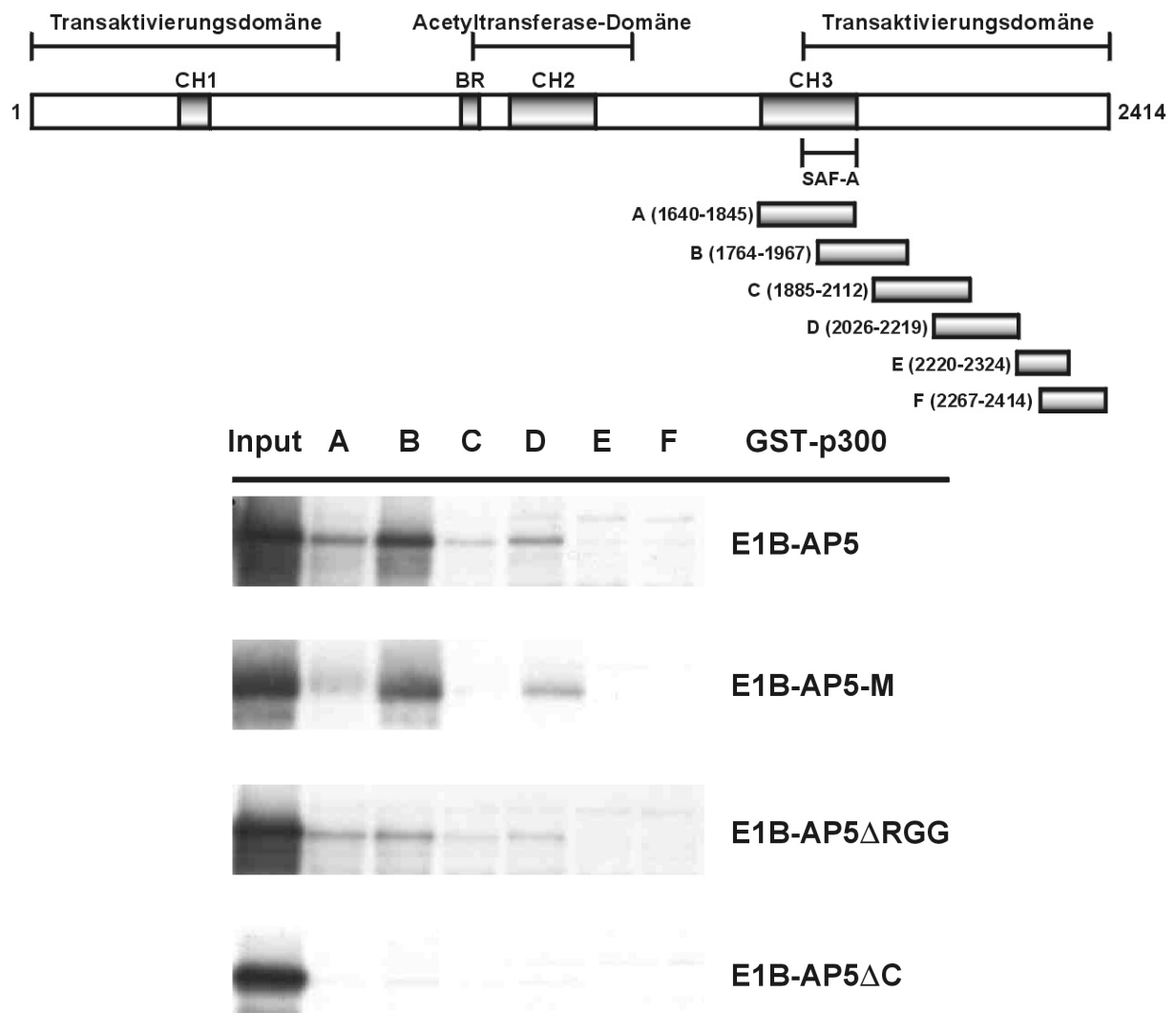


Abb. 21 GST-Pulldown zur Identifizierung von E1B-AP5-p300-Interaktionsdomänen

Dargestellt sind funktionelle Domänen des p300-Proteins (oben). Die Boxen unterhalb geben Bereiche an, die als GST-Fusionen exprimiert (4.6.3) und für GST-Pulldown-Versuche verwendet wurden. Die p300-Fragmente wurden mit *in vitro* translatierten (4.6.5) E1B-AP5-Proteinen inkubiert, mehrmals stringent gewaschen und über 12 %ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt. Zur Verstärkung der radioaktiven Signale wurde das Gel in *Enlight* (EnerGene) inkubiert und vakuumgetrocknet. Kosedimentierte Proteine wurden mittels Autoradiografie detektiert (unten). Die bekannte SAF-A-Interaktionsdomäne ist angegeben. CH1-3: Cystein-Histidin-reiche Regionen, BR: *bromo*-Domäne.

Auswertung der *GST-Pulldown*-Versuche (Abb. 21) ergab, dass das Volllängenprotein von E1B-AP5 vor allem mit dem p300-Fragment B (AS 1764 - 1967) kosedimentiert wurde. Vergleichbare Resultate wurden mit dem zentralen Teil von E1B-AP5 (AS 213 - 732) sowie der Deletionsmutante E1B-AP5 Δ RGG erzielt, wobei diese Mutante jedoch eine geringere Affinität zu den GST-p300-Fragmenten aufwies. Die Deletion der gesamten carboxyterminalen Region von E1B-AP5 führte zu einer vollständigen Aufhebung der Wechselwirkung mit p300. Diese Ergebnisse deuten an, dass das E1B-AP5-Protein mit einer die CH3-Region umfassenden Region des p300-Polypeptids wechselwirkt. Die Interaktionsdomäne von E1B-AP5 kann dabei auf die carboxyterminale Domäne im Bereich der Aminosäurereste 454 - 732 kartiert werden. Die beobachtete Verringerung der Affinität der *in vitro* translatierten RGG-Deletionsmutante lässt zusätzlich vermuten, dass die p300-Interaktion die RGG-Domäne des E1B-AP5-Proteins mit einschließt.

Zusammenfassend lassen die vorliegenden Daten den Schluss zu, dass das E1B-AP5-Protein an der Regulation der zellulären Genexpression beteiligt ist. Dabei wurden verschiedene funktionelle Bereiche im E1B-AP5-Polypeptid kartiert, welche den Einfluss auf die Transkriptionsregulation vermitteln (Abb. 22). Zum einen wurde die repressorische Domäne, welche die Basalaktivität verschiedener zellulärer und viraler Promotoren verringert, im aminoterminalen Teil des Proteins lokalisiert. Zum anderen wurden verschiedene zelluläre Kofaktoren identifiziert, die an der Transkriptionsregulation beteiligt sind. Deren Interaktionsdomänen wurden auf definierte Bereiche in der carboxyterminalen Hälfte des E1B-AP5-Polypeptid eingegrenzt.

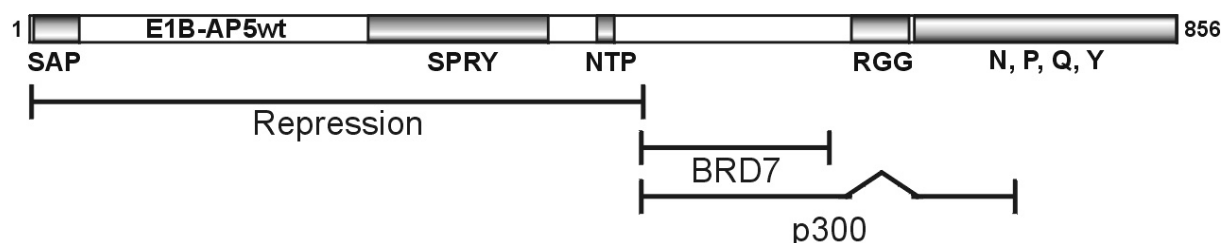


Abb. 22 Funktionsdomänen der Transkriptionsregulation von E1B-AP5

Die schematische Übersicht gibt die Lage der identifizierten Funktionsdomänen in der Primärstruktur von E1B-AP5 wieder, die an der Regulation der Transkription beteiligt sind. Die repressorische Domäne ist im aminoterminalen Teil des Proteins lokalisiert, die BRD7- und p300-Interaktionsdomänen wurden auf die carboxyterminale Region eingegrenzt.

5.2 Genomische Organisation des E1B-AP5-Gens

5.2.1 Chromosomale Lokalisation und Exon-Intron-Struktur des E1B-AP5-Gens

Aufgrund der multifunktionellen Natur des E1B-AP5-Proteins sollten Analysen zur Aufklärung der Regulation des E1B-AP5-Gens durchgeführt werden. Dazu wurden zunächst die chromosomale Lokalisation und der genomische Kontext der E1B-AP5-Transkriptionseinheit näher untersucht. Zur Bestimmung der chromosomalen Lokalisation des E1B-AP5-Gens wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Hameister (Universität Ulm) Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierungen (FISH) durchgeführt. Zusammenfassend wurde durch die Hybridisierung humaner Metaphasechromosomen mit fluoreszenzmarkierten cDNA-Sonden die E1B-AP5-Transkriptionseinheit im mittleren Bereich des langen Arms von Chromosom 19 in der Region q11.2 - q13.2 lokalisiert. Zusätzliche Datenbankanalysen mit Hilfe des *Genome-servers* (3.7) bestätigten die Lokalisation des E1B-AP5-Genlokus auf Chromosom 19 in der Region q13.13 des langen Arms in einer Zentromer 5' → 3' Telomer Orientierung. Basierend auf dem Vergleich der ursprünglich isolierten E1B-AP5-cDNA mit der Sequenz eines genomischen *contigs* von Chromosom 19 (*accession number* NT_011109.13), wurde unter Verwendung des *MegaBlast-servers* (3.7) die Exon-Intron-Struktur von E1B-AP5 bestimmt (Abb. 23). Die Auswertung der Daten ergab, dass das E1B-AP5-Gen aus 15 Exons zusammengesetzt ist und 43 kBp genomischer Sequenz umfasst. Die Exon-Intron-Übergänge entsprechen dabei der



Abb. 23 Exon-Intron-Struktur des E1B-AP5-Gens

Dargestellt ist die Exon-Intron-Struktur von E1B-AP5 die sich aus dem Vergleich der cDNA mit genomischen Sequenzen von Chromosom 19 ableiten ließ. Das Startkodon (ATG) liegt im Exon 1, an Position 174 der Nukleotidsequenz der cDNA. Das Stopkodon (TAG) liegt im Exon 15 an Nukleotidposition 2742. Das gesamte E1B-AP5-Gen erstreckt sich über mindestens 43 kBp. Exons werden durch Boxen, Introns durch Linien wiedergegeben. Zu beachten ist der unterschiedliche Maßstab für Exon- und Intronbereiche.

Tab. 3 Exon-Intron-Übergänge von E1B-AP5

EXON	GRÖßE ¹	SPLEIß-AKZEPTOR ²	SPLEIß-DONOR ²	INTRON-GRÖßE ¹
1	468	-	CGGACATTgtgagagt	3424
2	123	gttttaagATGCCATG	TCGTCCAGgtaggaaa	3736
3	154	gacaatagAAATGAAG	GATAGGAGgtgggtgt	1746
4	74	aaatacagGGGCCGCT	TGACACCTgtaagtct	2103
5	140	cttcacagATAACTGC	AGATGAAGgtgagtag	2778
6	100	ttcctcagATCAATGA	CCAGCTAGgtaaggag	1986
7	113	tccgtcagGCGAAGAG	GCTTTTCGcgtgagtgc	10969
8	267	tctcctagGATTTTGA	AATGTGAGgtgagtgg	1826
9	123	tcttgtagATTCTGAT	AGATGCGGgtaaggcc	97
10	129	gcccgcagGTGATGGG	TAGATCAGgtacttaa	6849
11	169	acccttagACAAATGT	AATGAAAGgtaggaaa	960
12	285	cctcctagCCAAC TTC	CCGAGGAGgtgagaca	1022
13	290	caacacagGTTTCAAC	CTCCACAGgtgagaga	1414
14	192	ctttccagCCGAGTTA	ATCAGCAGgtaggtgc	581
15	880	ttccccagTATGCCCA	-	-

¹ Größenangaben in Bp;

² Intronsequenzen in Kleinbuchstaben, Exonsequenzen in Großbuchstaben

klassischen 5' Spleiß-Donor 3' Akzeptor Konsensus-Regel GT-AG (Knippers, 1997) und die Exongrößen variieren zwischen 74 - 880 Bp, die Introngrößen zwischen 97 - 10969 Bp (Tab. 3). Das Startkodon der kodierenden Sequenz liegt im Exon 1, das Stopkodon im Exon 15. Die 5' nicht translatierte Region (NTR) der abgeleiteten mRNA umfasst 173 Basen, die 3' NTR 768 Basen.

5.2.2 Promotorstruktur der E1B-AP5-Transkriptionseinheit

Basierend auf den genomischen Daten von E1B-AP5 wurde ein Sequenzabschnitt mit einem Umfang von 500 Bp *upstream* plus 100 Bp *downstream* des postulierten Transkriptionsstarts mit dem *GenomatixSuite*-Softwarepaket (3.7) analysiert. Die Suche nach DNA-Motiven für bekannte Transkriptionsfaktoren zur Regulation des RNA-Polymerase II-Komplexes ergab (Abb. 24), dass der abgeleitete Minimalpromotor P1 überraschenderweise keine TATA-Box aufweist. Auffallend ist jedoch die Kumulation verschiedener vorhergesagter Bindestellen für Transkriptions-

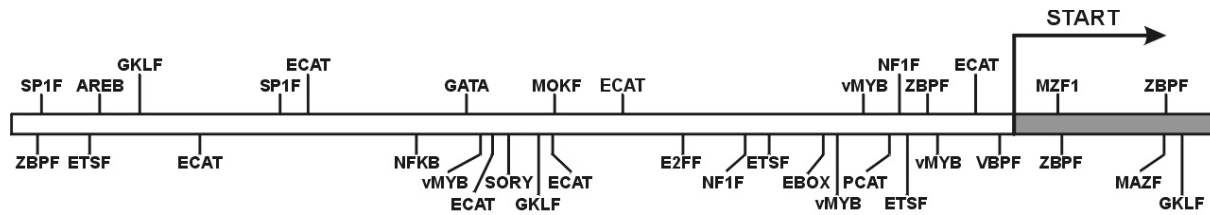


Abb. 24 Schematische Darstellung des E1B-AP5-Minimalpromotors P1

Dargestellt sind die Positionen vorhergesagter Bindestellen von Transkriptionsfaktor-Familien, deren *core*-Sequenzen eine 100%ige und deren *matrix*-Sequenzen eine mindestens 90%ige Übereinstimmung mit der Promotorsequenz von E1B-AP5 aufweisen. Bei überlappenden Bindestellen in gleicher Orientierung wurden die Faktoren mit der höchsten Homologie berücksichtigt. Die 5' NTR von E1B-AP5 ist grau ausgefüllt dargestellt, der bisher bekannte Transkriptionsstart wurde angegeben (START). Die Bezeichnungen oberhalb geben Bindestellen wieder, die in *sense*-Richtung, unterhalb, die in *antisense*-Richtung orientiert sind. **AREB**: *Atp1a1 regulatory element binding*, **E2FF**: *E2F-myc activator/cell cycle regulator*, **EBOX**: *E-Box binding factors*, **ECAT**: *Enhancer CCAAT binding factors*, **ETSF**: *ETS1 factors*, **GATA**: *GATA binding factors*, **GKLf**: *Gut-enriched Krueppel like binding factor*, **MAZF**: *Myc associated zinc fingers*, **MOKF**: *mouse Krueppel like factor*, **MZF1**: *Myeloid zinc finger 1 factors*, **NF1F**: *Nuclear factor 1*, **NFKB**: *Nuclear factor kappa B/c-rel*, **PCAT**: *Promoter CCAAT binding factors*, **SORY**: *SOx/sRY-sex/testis determing and related HMG-Box factors*, **SP1F**: *GC-Box factors SP1/GC*, **VBPF**: *chicken Vitellogenin gene binding protein factor*, **vMYB**: *AMV viral myb oncogene*, **ZBPF**: *zinc binding protein factors* (Nomenklatur der TRANSFAC-Datenbank entnommen).

faktoren im Bereich des postulierten Transkriptionsstarts von E1B-AP5. Aufgrund des Fehlens einer Interaktionsdomäne für das TATA-bindende Protein wird die Wechselwirkung mit dem Präinitiationskomplex der basalen Transkriptionsmaschinerie vermutlich durch Mitglieder der ZBPF-Proteinfamilie (Koritschoner *et al.*, 1997), sowie mehrere CCAAT-Box-bindende Proteine vermittelt (zur Übersicht: Mantovani, 1999).

5.2.3 Bestimmung des Transkriptionsstarts von E1B-AP5

Interessanterweise wurden bei der Expressionsanalyse von E1B-AP5 durch *Northern-Blot*-Analysen von Gabler und Mitarbeitern (Gabler *et al.*, 1998) zwei Signale detektiert, die auf Transkripte mit einer Länge von ca. 3,8 bzw. 3,2 kB zurückzuführen waren und ursprünglich durch alternative Polyadenylierung erklärt wurden. Eine direkte Bestimmung des Transkriptionsstarts wurde jedoch nicht durchgeführt. Hinsichtlich des Fehlens einer TATA-Box in der bisher identifizierten Promotorregion stellte sich die Frage, ob die beiden Transkript-Varianten auch durch die Verwendung alternativer Transkriptionsstarts hervorgerufen werden könnten. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde in dieser Arbeit der

Transkriptionsstart von E1B-AP5 mit dem Verfahren der *5' rapid amplification of cDNA ends* (5' RACE; 4.5.5) bestimmt. Diese Methode ist in mehrere Schritte gegliedert (Abb. 25) und ermöglicht letztendlich die molekulare Analyse des resultierenden Produkts und damit die Identifizierung des Transkriptionsstarts.

Basierend auf der Exon-Intron-Struktur der E1B-AP5-Transkriptionseinheit wurden genspezifische Oligonukleotide verwendet, die in verschiedenen Exons von E1B-AP5 eine Bindestelle beinhalten (Abb. 26). Dadurch werden genomische Kontaminationen wegen der enthaltenen Introns vermieden oder sind von der cDNA, basierend auf der abweichenden Größe leicht zu unterscheiden. Aufgrund der Tatsache, dass insbesondere die 5' NTR von E1B-AP5 einen außerordentlich hohen GC-Gehalt aufweist (74 %) wurde zusätzlich ein modifiziertes Protokoll zur Durchführung der 5'RACE verwendet (4.5.5). Dadurch wurde sichergestellt, dass Sekundärstrukturen

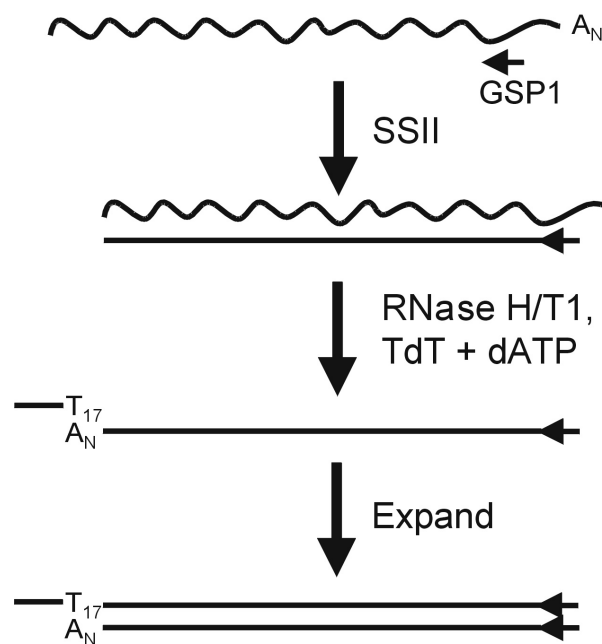


Abb. 25 Prinzip der *5' rapid amplification of cDNA ends* (5' RACE)

Dargestellt ist der schematische Ablauf der Transkriptionsstart-Bestimmung mittels des *5' RACE*-Systems nach einem modifizierten Protokoll (4.5.5). Isolierte mRNA wird unter Verwendung der *SuperScript II Reverse Transcriptase* (SSII) und eines genspezifischen Oligonukleotids (GSP1) in cDNA umgeschrieben. Nach Abbau der Matrizen-RNA mit den RNasen H und T1 erfolgt die Aufreinigung der cDNA und die homopolymere Verlängerung mit dATP unter Verwendung des Enzyms Terminale Desoxynukleotid Transferase (TdT). Es folgt die Synthese des Komplementärstranges mit einer thermostabilen DNA-Polymerase (Expand) unter Verwendung eines Anker-Oligonukleotids bestehend aus einem Oligo-dT Sequenzanteil sowie einem Überhang mit der Sequenzinformation für ein Amplifikations-Oligonukleotid. Das resultierende Produkt wird abschließend *in vitro* durch PCR vermehrt.

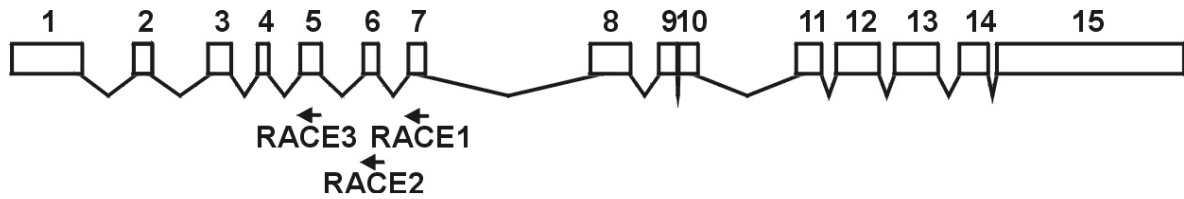


Abb. 26 Bindestellen der für die 5' RACE verwendeten genspezifischen Oligonukleotide

Dargestellt ist das Spleißmuster der E1B-AP5-Transkriptionseinheit. Die Bindestellen der verwendeten Oligonukleotide sind durch Pfeile markiert. Für die reverse Transkription wurde das Oligonukleotid AP5-5'RACE1 (RACE1) verwendet. Die nachfolgenden PCR-Amplifikationen wurden mit den Oligonukleotiden AP5-5'RACE2 und 3 (RACE2 und 3) durchgeführt.

der mRNA und der resultierenden cDNA aufgelöst und unspezifische Wechselwirkungen des Anker-Oligonukleotids mit der cDNA minimiert werden.

Zur Durchführung des 5' RACE-Protokolls wurde zytoplasmatische RNA aus HeLa-Zellen isoliert (4.5.1) und mit dem Oligonukleotid AP5-5'RACE1 in die reverse Transkriptionsreaktion eingesetzt (4.5.5.1). Nach Aufreinigung (4.5.5.2) und homopolymerer Verlängerung der cDNA (4.5.5.3) wurde die Zweitstrangsynthese (4.5.5.4) mit dem Anker-Oligonukleotid dT-Adap durchgeführt. Es folgte eine PCR-Amplifikation (4.4.5) mit den Oligonukleotiden AUAP und AP5-5'RACE2. Das Produkt wurde aufgereinigt (4.5.5.2) und erneut in eine PCR (4.4.5) mit den Oligonukleotiden AUAP und AP5-5'RACE3 eingesetzt. Parallel wurde eine Amplifikation mit den Oligonukleotiden AP5-5'RACE3 und RT-AP5-Var-7 durchgeführt, welches am äußersten 5' Bereich der cDNA von E1B-AP5 bindet und als Positivkontrolle fungierte. Die Produkte wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (4.4.3). Es zeigte sich (Abb. 27), dass insgesamt vier Fragmente (A - D) mit unterschiedlicher Effizienz durch das 5' RACE-Verfahren amplifiziert wurden, mit den Fragmenten A und D als prominenteste Hauptprodukte. In der als Positivkontrolle durchgeführten RT-PCR-Reaktion wurden nur zwei der Fragmente (A und B) erhalten, wobei das Hauptprodukt A als prominente Bande im Agarosegel identifiziert wurde. Durch Vergleich mit einem parallel aufgetragenen Längenstandard wurden die Größen der Produkte bestimmt. Basierend auf den vorhandenen Sequenzinformationen ist für den bisher bekannten Transkriptionsstart ein Produkt mit einer Größe von 958 Bp zu erwarten. Die vorliegenden Daten deuteten an, dass das Produkt A mit einer Größe von ca. 975 Bp

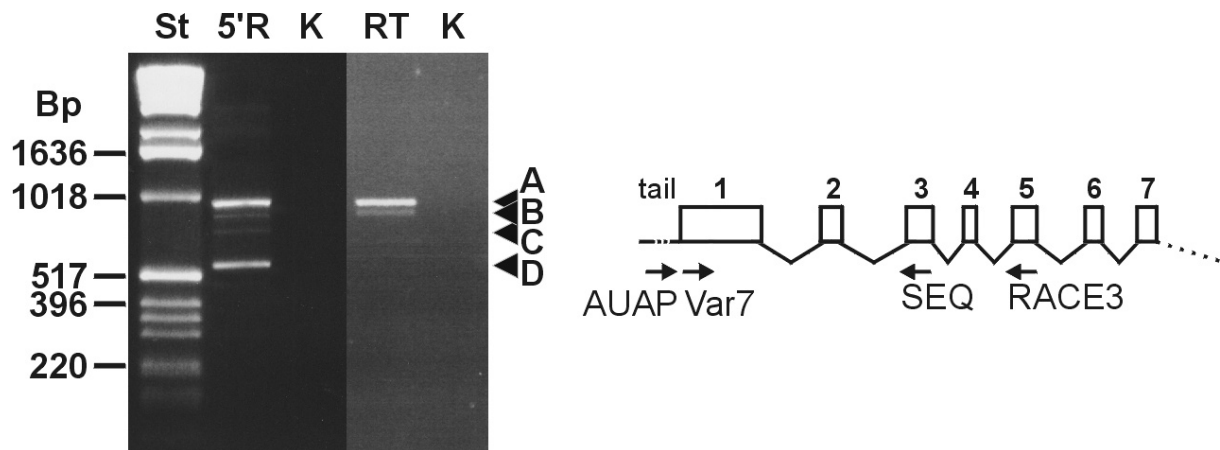


Abb. 27 Nachweis der Produkte der Transkriptionsstart-Bestimmung mittels 5' RACE

Die Produkte der 5' RACE (5'R) sowie der direkten RT-PCR (RT) wurden mittels einem 1 %igen Agarosegel analysiert (links). Die erhaltenen Fragmente wurden mit den Buchstaben A - D gekennzeichnet. Wie erwartet wurden keine Produkte in den Negativkontrollen (K) amplifiziert. Die Größen (in Bp) einiger Referenzbanden des verwendeten DNA-Längenstandards (St) sind angegeben. Die Bindestellen der für die Amplifikation (AUAP, RT-AP5-Var7 und AP5-5'RACE3) und Sequenzierung (AP5-Var-Seq) verwendeten Oligonukleotide sind in der Übersicht (rechts) angegeben.

mit dem zu erwarteten Fragment übereinstimmt, da es sowohl mit dem 5' RACE-Verfahren als auch in der Kontrolle durch direkte RT-PCR erhalten wurde. Die Identität der zusätzlich erhaltenen Produkte konnte anhand der Fragmentlängen nicht aufgeklärt werden. Ein unspezifischer Abbau der verwendeten RNA als Ursache der verschiedenen Amplifikationsprodukte wurde jedoch ausgeschlossen, da deren Überprüfung mittels Gelelektrophorese (4.5.3) keinen Hinweis auf RNase-Kontaminationen lieferte. Zur eindeutigen Identifizierung aller erhaltenen 5' RACE- und RT-PCR-Produkte wurden diese aus dem Gel isoliert (4.4.4) und die Sequenzen unter Verwendung des Oligonukleotids AP5-Var-Seq bestimmt (4.4.7). Diese wurden mit der bekannten Sequenz für die 5' Region von E1B-AP5 verglichen (Abb. 28). Es zeigte sich, dass für das Nebenprodukt C mit einer Länge von ca. 800 Bp keine eindeutige Sequenz erhalten wurde, was vermutlich auf unspezifischer Amplifikation während der einzelnen Schritte des 5' RACE-Verfahrens beruhte. Die Auswertung der Sequenz des Nebenprodukts B mit einer Länge von 850 Bp ergab, dass diese mit der abgeleiteten cDNA von E1B-AP5 im Bereich der Nukleotidpositionen 92 bis 363 von Exon 1 übereinstimmte. An Position 364 wurde jedoch ein direkter Übergang zur Sequenz von Exon 2 beobachtet und könnte somit auf einen alternativen Spleißprozess innerhalb von Exon 1 hindeuten.

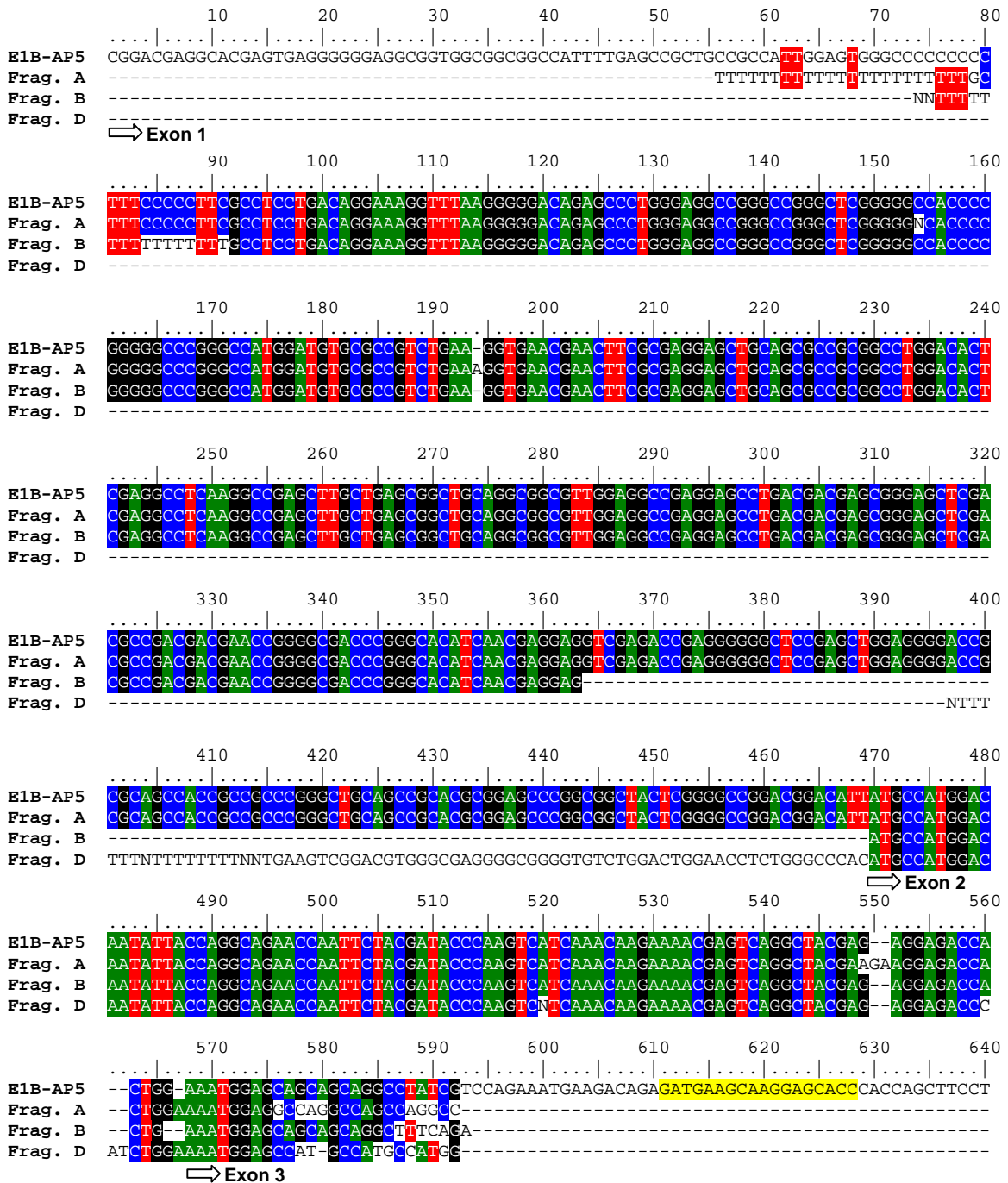


Abb. 28 Sequenzvergleich der 5' RACE-Fragmente mit der bekannten cDNA von E1B-AP5

Die Fragmente der 5' RACE wurden mit dem Oligonukleotid AP5-Var-Seq (gelb unterlegt) sequenziert und die erhaltene Basenabfolge (*reverse complement*) mit der cDNA von E1B-AP5 verglichen. Die Übergänge der einzelnen Exons sind durch Pfeile markiert. Die Positionsangaben beziehen sich auf das *alignment* mit der bekannten cDNA-Sequenz von E1B-AP5. Die in allen Sequenzen gefundenen Nukleotidsubstitutionen im Bereich des Übergangs von Exon 2 nach Exon 3 sind methodisch bedingt.

Das Hauptprodukt A wies keine Abweichung hinsichtlich des Übergangs von Exon 1 nach Exon 2 auf und stimmt mit der bekannten Sequenz der E1B-AP5-cDNA überein. Der an Position 80 der 5' Region von Exon 1 lokalisierte Übergang der E1B-

AP5-Sequenz in die des homopolymeren *tails* des 5' RACE-Produkts kennzeichnet das mit dieser Methode bestimmte 5' Ende der E1B-AP5-mRNA. Damit wurde der bisher bekannte Transkriptionsstart nicht bestätigt.

Die Auswertung der Sequenz des Hauptproduktes D ergab, dass diese ab Nukleotidposition 470 mit der cDNA-Sequenz von E1B-AP5 im Bereich des Exon 2 übereinstimmt. Für die Region *upstream* von Exon 2 wurde jedoch keine Homologie mit der bekannten Sequenz der cDNA von E1B-AP5 identifiziert. Diese Region wurde deshalb unter Verwendung des *MegaBlast-servers* (3.7) mit genomischen Sequenzen verglichen. Es zeigte sich, dass dieser 54 Bp umfassende Sequenzabschnitt mit einer Region 1822 Bp *upstream* von Exon 1 identisch war und als neues potenzielles Exon 1A bezeichnet wurde.

5.2.4 Nachweis alternativ gespleißter Transkripte von E1B-AP5

Die Ergebnisse der Transkriptionsstart-Bestimmung ließen den Schluss zu, dass neben dem bisher bekannten Transkript, alternativ gespleißte mRNAs von E1B-AP5 gebildet werden. Diese Vermutung wurde mittels RT-PCR-Analysen (4.5.4) überprüft. Zur Synthese der cDNA wurde zytoplasmatische RNA aus A549-, H1299-, HeLa- und MCF7-Zellen isoliert (4.5.1) und zusammen mit dem Oligonukleotid Oligo-dT in eine reverse Transkription (4.5.4) eingesetzt. Dadurch wurde sichergestellt, dass die Synthese der cDNA von polyadenylierter mRNA ausging. Diese wurde im Anschluss mittels PCR (4.4.5) amplifiziert. Dabei wurden Oligonukleotide verwendet, die sich aus Sequenzen von Exon 1A, Exon 1, Exon 2 und Exon 15 ableiteten. Die erhaltenen Produkte wurden schließlich durch Gelelektrophorese (4.4.3) analysiert. Es zeigte sich (Abb. 29), dass in allen Zelllinien mit den Exon 2- und Exon 15-spezifischen Oligonukleotiden je ein Produkt amplifiziert wurde, dessen Größe mit der vorhergesagten Länge des entsprechenden Bereichs der E1B-AP5-Transkriptionseinheit von 2149 Bp übereinstimmte. Dies wurde durch Sequenzierung der Fragmente bestätigt und zeigte, dass alternative Spleißprozesse *downstream* von Exon 2 unwahrscheinlich sind. Die Amplifikation der cDNA mit den Exon 1A- und Exon 15-spezifischen Oligonukleotiden ergab in allen

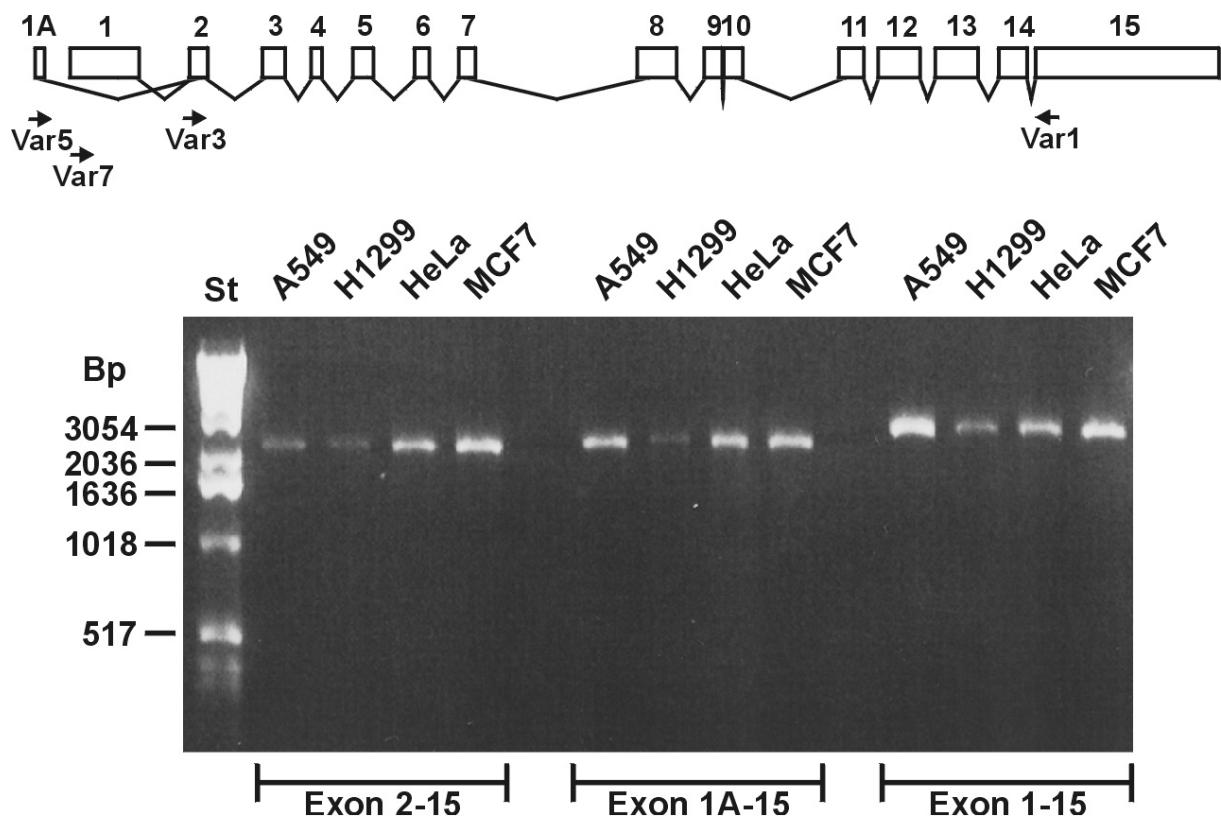


Abb. 29 Nachweis alternativ gespleißter E1B-AP5-Transkripte

Für den Nachweis der verschiedenen Spleißvarianten wurde die cDNA der angegebenen Zelllinien mit unterschiedlichen Oligonukleotiden durch PCR *in vitro* vermehrt. Als interne Kontrolle wurde zunächst der Bereich von Exon 2 - 15 unter Verwendung der Oligonukleotide RT-AP5-Var3 und -Var1 amplifiziert. Zum Nachweis des alternativ gespleißten E1B-AP5-Transkripts wurde neben dem Exon 15-spezifischen das Exon 1A-spezifische Oligonukleotid RT-AP5-Var5 verwendet. Analog wurde das Wildtyp-Transkript mit dem Exon 1-spezifischen Oligonukleotid RT-AP5-Var7 amplifiziert. Die Produkte wurden mittels einem 1 %igen Agarosegel visualisiert. Die Größen (in Bp) einiger Referenzbanden des verwendeten DNA-Längenstandards (St) sind angegeben. Die Bindestellen der für die Amplifikation verwendeten Oligonukleotide (RT-AP5-Var5, RT-AP5-Var7, RT-AP5-Var3 und RT-AP5-Var1) sind in der Übersicht des Spleißmusters von E1B-AP5 (oben) vermerkt.

Zelllinien ein Produkt mit der erwarteten Länge von 2215 Bp. Durch Sequenzierung der Fragmente wurde der direkte Übergang von Exon 1A nach Exon 2 nachgewiesen. Außerdem wurden keine zusätzlichen Abweichungen *downstream* von Exon 2 detektiert. Dies bestätigte das Ergebnis der 5' RACE, die auf eine alternativ gespleißte mRNA-Spezies von E1B-AP5 schließen ließ. Die Analyse des durch die Exon 1- und Exon 15-spezifischen Oligonukleotide amplifizierten Produkts mit einer Länge von ca. 2600 Bp ergab zunächst, dass die erhaltene Sequenz im Exon 1 an Nukleotidposition 362 einen direkten Übergang zu Exon 2 aufwies und damit dem Nebenprodukt B der 5' RACE entsprach. Allerdings wurden keine weiteren

Abweichungen von der bisher bekannten cDNA-Sequenz *downstream* von Exon 1 gefunden.

Aufgrund der Tatsache, dass unter den Bedingungen der RT-PCR (4.5.4) kein Produkt erhalten wurde, welches das gesamte Exon 1 beinhaltete, wurde der 5' Bereich der cDNAs unter Verwendung der optimierten Bedingungen der 5' RACE (4.5.5) gesondert untersucht. Die mRNA der verwendeten Zelllinien wurde mit dem Oligonukleotid Oligo-dT in die reverse Transkription unter den Bedingungen der 5' RACE (4.5.5.1) in cDNA umgeschrieben. Auch hier war sichergestellt, dass polyadenylierte mRNA als Matrize für die reverse Transkription verwendet wurde. Die nach Amplifikation des Bereichs von Exon 1A bis Exon 7 bzw. Exon 1 bis Exon 7 erhaltenen Produkte wurden mittels Gelelektrophorese (4.5.3) analysiert. Es zeigte sich hinsichtlich der erhaltenen Fragmentgrößen ein zur 5' RACE vergleichbares Resultat (Abb. 30). Im Gegensatz zu den anfangs verwendeten Standardbedingungen der RT-PCR wurden unter den veränderten Bedingungen für das Amplifikationsprodukt im Bereich von Exon 1 bis Exon 7 zwei Banden detektiert

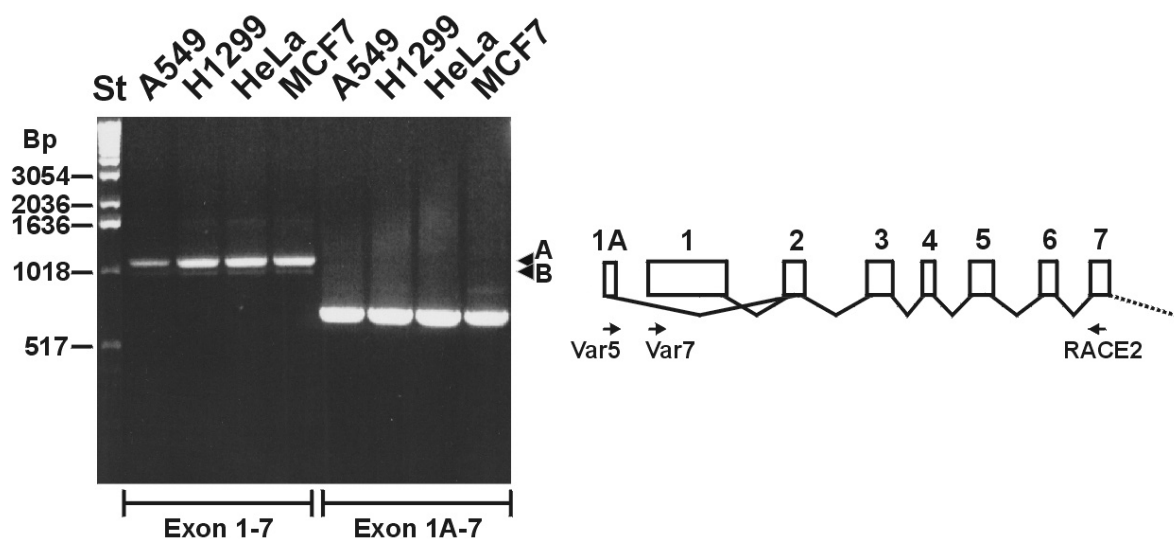


Abb. 30 Analyse des 5' Bereichs der Spleißvarianten von E1B-AP5

Zur Analyse des 5' Bereichs der alternativ gespleißten E1B-AP5-Transkripte wurde das Exon 1-spezifische Oligonukleotid RT-AP5-Var7 zusammen mit dem Exon 7-spezifischen Oligonukleotid AP5-5'RACE2 verwendet. Analog wurde die Spleißvariante mit dem Exon 1A-spezifischen Oligonukleotid RT-AP5-Var5 amplifiziert. Die Produkte wurden mittels einem 1%igen Agarosegel visualisiert. Die Größen (in Bp) einiger Referenzbanden des verwendeten DNA-Längenstandards (St) sind angegeben. Die Bindestellen der für die Amplifikation verwendeten Oligonukleotide (RT-AP5-Var5, RT-AP5-Var7 und AP5-5'RACE2) sind in der Übersicht des Spleißmusters von E1B-AP5 (rechts) vermerkt.

(A und B). Die Sequenzierung beider Fragmente ergab, dass das Hauptprodukt A die vollständige Sequenz von Exon 1 enthielt, während das Nebenprodukt B die beschriebene Verkürzung aufwies. Dieses Ergebnis führte zu der Schlussfolgerung, dass die detektierte Verkürzung von Exon 1 höchstwahrscheinlich auf nicht aufgelöste Sekundärstrukturen der zugrunde liegenden mRNA zurückzuführen ist und nicht durch alternatives Spleißen innerhalb von Exon 1 verursacht wird. Die Sequenzierung des Exon 1A - 7-spezifischen Fragments bestätigte die bisherigen Ergebnisse hinsichtlich des alternativ gespleißten Transkripts E1B-AP5-A.

Die weitere Analyse ergab, dass im direkten Anschluss der identifizierten Exon-1A-Sequenz im genomischen Kontext eine Spleißdonorstelle mit der Sequenzabfolge **GTGAGTG** lokalisiert ist, welche der Konsensus-Sequenz der Spleißdonoren **GT(G/A)AGT(G/A)** des E1B-AP5-Gens entspricht. Dies führte zur Schlussfolgerung, dass eine bisher nicht bekannte Spleißvariante von E1B-AP5 isoliert wurde, welche statt dem Exon 1 ein alternatives Exon 1A enthält (Abb. 31). Die weiterführende Analyse der Sequenz des alternativen Exons 1A ergab, dass dieses

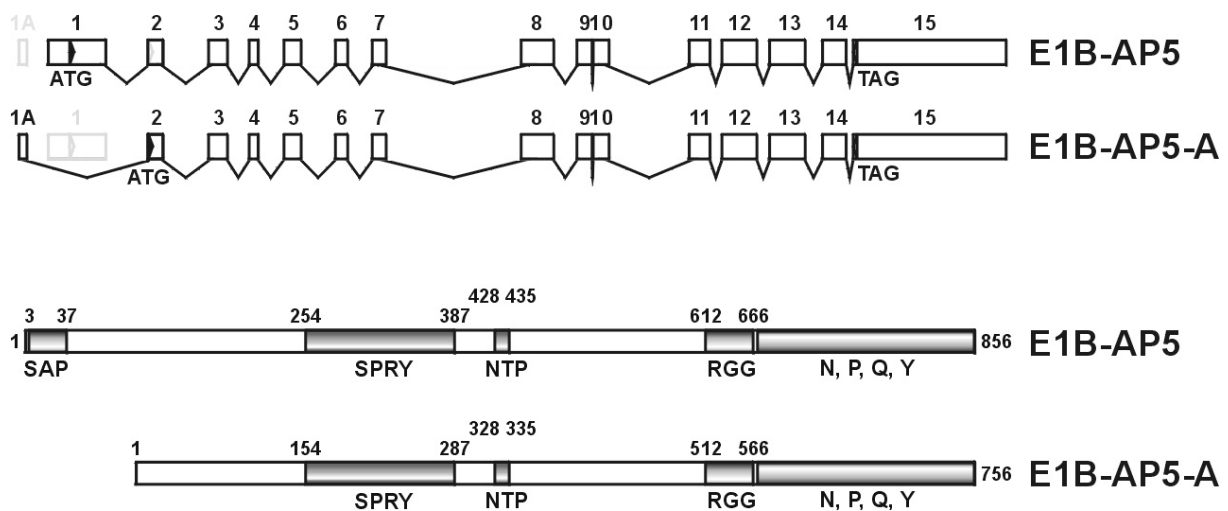


Abb. 31 Schematische Übersicht der E1B-AP5-Isoformen

Dargestellt ist die schematische Übersicht des Spleißmusters (oben) des bisher bekannten Transkripts E1B-AP5 und der in dieser Arbeit identifizierten Spleißvariante E1B-AP5-A. Die jeweils nicht enthaltenen Exons sind hellgrau eingefärbt. Die Startkodons (ATG), welche den vermutlichen Beginn der Leserahmen repräsentieren sowie die Stopkodons (TGA) sind angegeben. Die Zahlen oberhalb geben die Nummer der Exons wieder. Die ableitbaren Polypeptide (unten) unterscheiden sich im aminoterminalen Bereich von E1B-AP5: die Isoform E1B-AP5-A ist um 100 Aminosäuren verkürzt und verfügt nicht über die identifizierte SAP-Homologiedomäne. Die Zahlen oberhalb geben die jeweilige Aminosäureposition an.

vermutlich nicht kodierende Eigenschaften besitzt. Der einzig durchgehende Leserahmen, der in der Spleißvariante zu identifizieren ist, beginnt im Exon 2 mit einem *in frame* ATG-Startkodon in der bevorzugten Sequenzumgebung CCATGG. Das resultierende Polypeptid zeichnet sich durch eine Verkürzung der 100 aminoterminalen Aminosäurereste von E1B-AP5 aus. Interessanterweise beinhaltet diese Verkürzung die im E1B-AP5-Volllängenprotein identifizierte SAP-Homologiedomäne. Zur Unterscheidung wurde für die neu identifizierte Isoform die Bezeichnung E1B-AP5-A verwendet.

5.2.5 Struktur des alternativen E1B-AP5-Promotors P1A

Aufgrund der räumlichen Trennung der alternativen Exons 1A und 1 wurde die gesonderte Regulation Exon 1A-beinhaltenender Transkripte postuliert und ein Bereich von 500 Bp *upstream* plus 100 Bp *downstream* des identifizierten Transkriptionsstarts mit dem *GenomatixSuite*-Softwarepaket (3.7) analysiert. Die Suche nach DNA-Motiven für bekannte Transkriptionsfaktoren ergab (Abb. 32), dass auch der

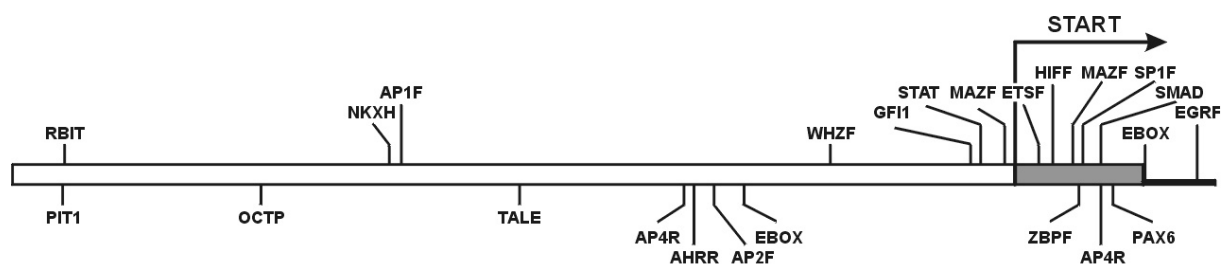


Abb. 32 Schematische Darstellung des alternativen E1B-AP5-Promotors P1A

Dargestellt sind die vorhergesagten Bindestellen von Transkriptionsfaktor-Familien deren *core*-Sequenzen eine 100 %ige und deren *matrix*-Sequenzen eine mindestens 90 %ige Übereinstimmung mit der alternativen Promotorsequenz von E1B-AP5 aufweisen. Bei überlappenden Bindestellen in gleicher Orientierung wurden die Faktoren mit der höchsten Homologie berücksichtigt. Die 5' NTR des Exons 1A von E1B-AP5 ist grau ausgefüllt dargestellt, der potenzielle Transkriptionsstart wurde angegeben (START). Der Sequenzbereich des Introns 1A ist als schwarzer Balken wiedergegeben. Die Bezeichnungen oberhalb geben Bindestellen wieder die in *sense*-Richtung, unterhalb die in *antisense*-Richtung orientiert sind. **AHRR**: AHR-arnet heterodimers and AHR-related factors, **AP1F**: AP1 and related factors, **AP2F**: Activator protein 2, **AP4R**: AP4 and related proteins, **EBOX**: E-Box binding factors, **EGRF**: EGR/nerve growth factor induced protein C and related factors, **ETSF**: ETS1 factors, **GFI1**: Growth factor independence-transcriptional repressor, **HIFF**: Hypoxia inducible factor, bHLH / PAS protein family, **MAZF**: Myc associated zinc fingers, **NKXH**: NKX/DLX - Homeodomain sites, **OCTP**: OCT1 binding factor (*pou*-specific domain), **PAX6**: PAX-4/PAX-6 paired domain binding sites, **PIT1**: GHF-1 pituitary specific *pou* domain transcription factor, **RBIT**: Regulator of B-Cell IgH transcription, **SMAD**: Vertebrate SMAD family of transcription factors, **SP1F**: GC-Box factors SP1/GC, **STAT**: Signal transducer and activator of transcription factors, **TALE**: TALE Homeodomain class recognizing TG motives, **WHZF**: Winged helix and ZF5 binding sites, **ZBPF**: Zinc binding protein factors (Nomenklatur der TRANSFAC-Datenbank entnommen).

alternative Minimalpromotor P1A keine TATA-Box aufweist. Analog zum Promotor P1, kann auch in der Region P1A eine auffallende Kumulation von DNA-Sequenzmotiven für potenzielle Faktoren im Bereich der Initiationsregion identifiziert werden.

Insgesamt zeigen die vorliegenden Daten, dass neben dem bisher bekannten E1B-AP5-Transkript eine zusätzliche alternative mRNA-Variante in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen wurde. Im Unterschied zum bisher bekannten Transkript enthält die alternative mRNA das nicht kodierende Exon 1A, wodurch ein aminoterminal verkürztes Polypeptid abgeleitet werden kann. Die im Exon 1 lokalisierte SAP-Homologiedomäne des Vollängenproteins ist dabei deletiert. Ferner deuten die Daten darauf hin, dass die Synthese der jeweiligen mRNA-Spezies nicht nur durch differenzielles Spleißen reguliert wird, sondern zusätzlich spezifische Promotorregionen die Transkription der jeweiligen mRNA-Varianten beeinflussen.

5.3 Analysen zur Funktion der Isoform E1B-AP5-A

5.3.1 Modulation der Transkription durch E1B-AP5-A

Aufgrund der Isolierung der bisher unbekanntes mRNA-Variante von E1B-AP5 stellte sich die Frage, ob die abgeleitete Proteinisoform E1B-AP5-A grundlegende Unterschiede zu den identifizierten Funktionen des Vollängenproteins aufweist. Für die funktionellen Analysen wurde deshalb die kodierende Sequenz der Proteinisoform E1B-AP5-A in einen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert (4.4.6). Dazu wurde zunächst das Plasmid pHA-E1B-AP5 mit den Restriktionsenzymen *Nco* I und *Xho* I gespalten (4.4.6.1). Das *Nco* I/*Xho* I-Fragment, welches die kodierende Sequenz der Proteinisoform enthält, wurde zusammen mit der *Eco* RI/*Nco* I-gespaltenen Expressionskassette für das HA-Epitop (ermöglicht den immunzytochemischen Nachweis) in den *Eco* RI/*Xho* I-gespaltenen Vektor ligiert (4.4.6.2). Mit dem Ligationsansatz wurden schließlich elektrokompente *E. coli* SURE transformiert (4.1.2).

Analog zu den Versuchen hinsichtlich des transkriptionsregulatorischen Potenzials des Volllängenproteins E1B-AP5 wurde der Einfluss der transienten Überexpression von E1B-AP5-A auf die basale Aktivität der SV40-, TK- und Ad5-E1B-Promotoren (5.1.1.1) analysiert. Die Auswertung der Daten ergab (Abb. 33), dass die Isoform E1B-AP5-A nur eingeschränkt in der Lage war die basale Aktivität der getesteten Promotoren zu verringern. Die Syntheserate des Luziferase-Reporters wurde mit 43 - 64 % des Referenzniveaus bestimmt, wobei die stärkste Repression im Kontext des TK-Promotors, die schwächste Repression im Kontext des SV40-Promotors beobachtet wurde. Im Vergleich zum Volllängenprotein mit 24 - 34 % des Referenzniveaus, war die Restaktivität der Promotoren jedoch fast um das Zweifache erhöht. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die Isoform E1B-AP5-A grundlegende repressorische Eigenschaften aufweist, für die vollständige Funktion

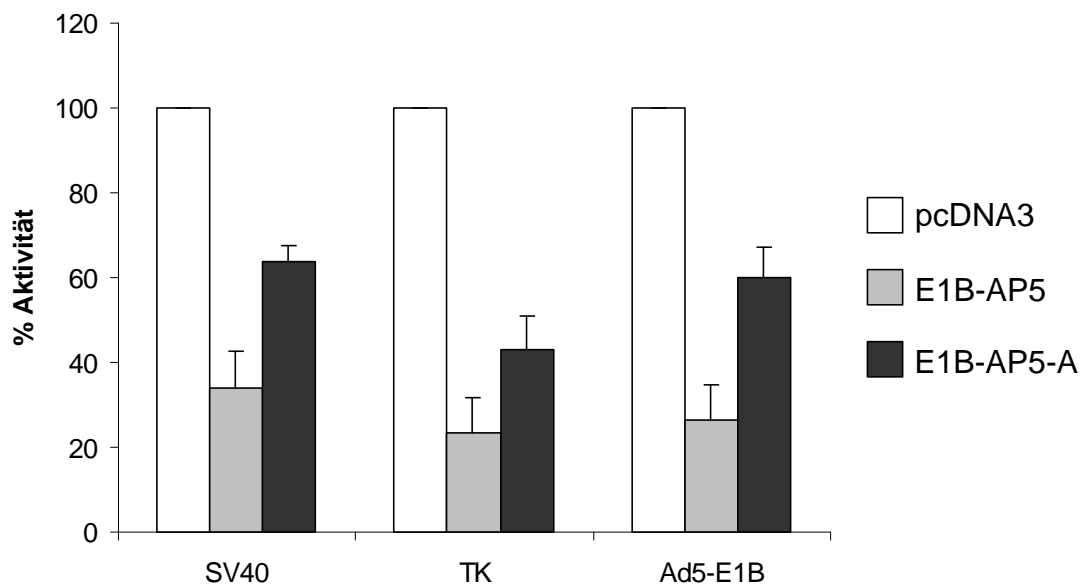


Abb. 33 Repression basaler Promotoraktivität durch das E1B-AP5-A-Protein

Es wurden je $2,5 \times 10^5$ H1299-Zellen in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen ausgesät und am nächsten Tag mit $0,3 \mu\text{g}$ der folgenden Reporterplasmide transfiziert (4.2.3.1): pGL2-control (*simian virus 40*-Promotor; SV40), pGL BL-Luc (Herpes Simplex-Virus Thymidin-Kinase-Promotor; TK) und pGL E1B-Luc (Ad5 E1B-Promotor; Ad5-E1B). Gleichzeitig wurden jeweils $0,1 \mu\text{g}$ des Kontrollplasmids pRL-CMV und $1,6 \mu\text{g}$ der Effektorplasmide pcDNA3, pHA-E1B-AP5wt oder pHA-E1B-AP5-A transfiziert (4.2.3.1). Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit Lysis-Puffer (Promega) lysiert und die Aktivität der Promotoren durch Messung der Luziferase-Menge luminometrisch bestimmt (*Dual-Luciferase Assay System*; Promega; 4.8). Die gemessene Luziferase-Menge in den Kontrollansätzen mit pcDNA3 wurde auf 100 % normiert und als Basis zur Berechnung der Effektorplasmid-vermittelten Promotoraktivität verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus vier unabhängigen Versuchen.

jedoch die aminoternale Region des E1B-AP5-Volllängenproteins notwendig ist. Die Hypothese, dass die aminoternale Domäne zusätzliche Funktionen in der Transkriptionsregulation vermittelt, wurde anschließend im Kontext der Modulation der nicht induzierten Aktivität des MMTV-Promotors überprüft. Es zeigte sich (Abb. 34), dass die transiente Überexpression der Isoform E1B-AP5-A im Gegensatz zum Volllängenprotein keinen Einfluss auf die Syntheserate des Reporterergen-Produkts hatte. Die Aktivität entpricht mit 101 % dem Referenzniveau der Vektorkontrolle pcDNA3. Das bedeutet, dass für die Transaktivierung des nicht induzierten MMTV-Promotors die Region der Aminosäurereste 1 - 100 notwendig zu sein scheint.

Insgesamt zeigen die vorliegenden Daten, dass neben den bisher identifizierten Domänen der Transkriptionsregulation, die aminoternale Region des

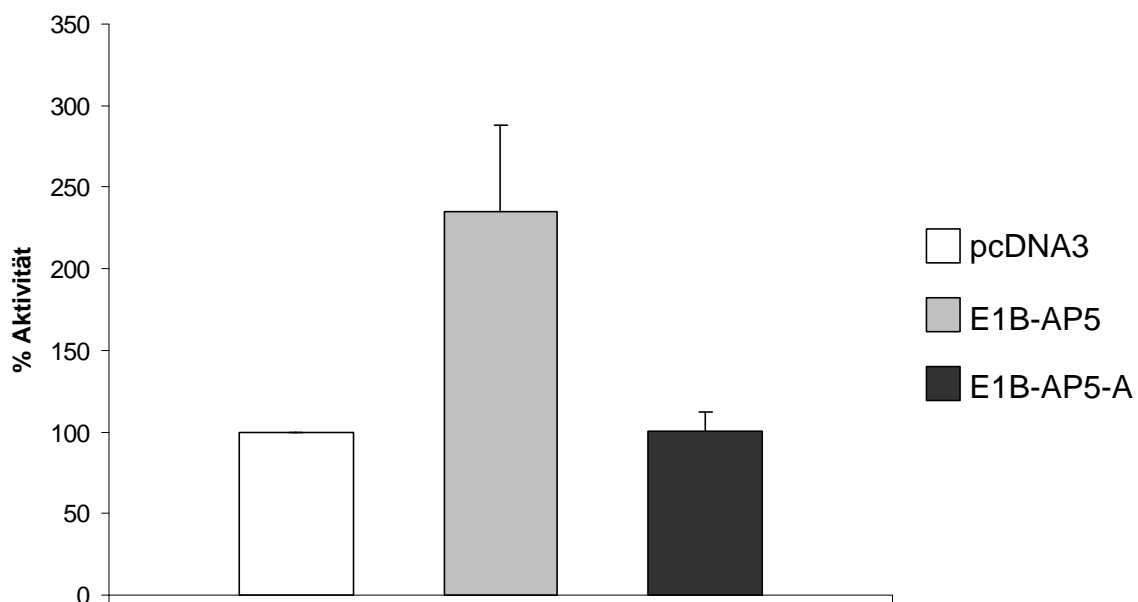


Abb. 34 Repression basaler MMTV-Promotoraktivität durch das E1B-AP5-A-Protein

Es wurden je $2,5 \times 10^5$ H1299-Zellen in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen ausgesät und am nächsten Tag mit $0,3 \mu\text{g}$ des Reporterplasmids MMTV-Luc transfiziert (4.2.3). Gleichzeitig wurden jeweils $0,1 \mu\text{g}$ des Kontrollplasmids pRL-CMV und $1,6 \mu\text{g}$ der Effektorplasmide pcDNA3, pHA-E1B-AP5wt oder pHA-E1B-AP5-A transfiziert (4.2.3.1). Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen in Medium ohne Serum für 24 h weiter kultiviert. Nach Lyse der Zellen mit Lysis-Puffer (Promega) wurde die Aktivität des MMTV-Promotors durch Messung der Luziferase-Menge luminometrisch bestimmt (*Dual-Luciferase Assay System*; Promega; 4.8). Die gemessene Luziferase-Menge im Kontrollansatz mit pcDNA3 wurde auf 100 % normiert und als Basis zur Berechnung der Effektorplasmid-vermittelten Promotoraktivität verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus vier unabhängigen Versuchen.

Volllängenproteins E1B-AP5 zusätzliche funktionelle Eigenschaften besitzt. Durch die Synthese der mRNA-Variante E1B-AP5-A, welche für die aminoterminal verkürzte Proteinisoform E1B-AP5-A kodiert, scheint die Funktion der Transkriptionsregulation auch auf zellulärer Ebene moduliert zu werden.

5.3.2 Einfluss von E1B-AP5-A auf die Transformation primärer Nagetierzellen

Neben der in dieser Arbeit identifizierten Beteiligung des E1B-AP5-Proteins an der Regulation der zellulären Genexpression, zeigten frühere Arbeiten, dass die Expression von E1B-AP5 mit der Transformation primärer Nagetierzellen interferiert (Gabler *et al.*, 1998; Schütt, 2000). Folglich stellte sich die Frage, welchen Einfluss die Proteinisoform E1B-AP5-A auf den Transformationsprozess ausübt. Darüber hinaus war es von Interesse, inwieweit die BRD7-Wechselwirkung an der Reduktion der *Focus*-Bildung beteiligt ist. Dazu wurde die Proteinisoform E1B-AP5-A sowie die beiden BRD7-bindungsdefekten Mutanten E1B-AP5 Δ BBS1 und Δ BBS2 im Vergleich zum Volllängenprotein in Transformationsversuchen (4.2.4) mit der E1-Region von Ad5 getestet. Die Auswertung der Daten zeigte (Abb. 35), dass das E1B-AP5-

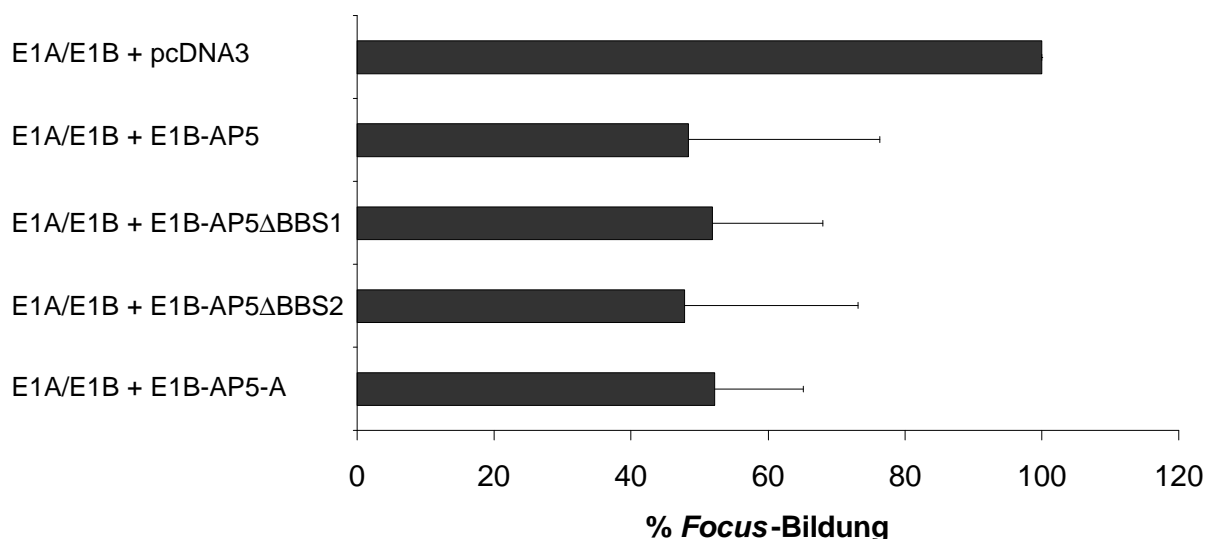


Abb. 35 Inhibition der E1A/E1B-vermittelten Transformation durch E1B-AP5

Es wurden je 3×10^6 primäre BRK-Zellen (4.2.1.2) mit $4 \mu\text{g}$ des E1A/E1B-kodierenden Plasmids pXC15 zusammen mit je $5 \mu\text{g}$ der Plasmide pcDNA3, pHA-E1B-AP5, pHA-E1B-AP5 Δ BBS1, pHA-E1B-AP5 Δ BBS2 oder pHA-E1B-AP5-A wie beschrieben transfiziert (4.2.4). Die mit Kristallviolett gefärbten *Foci* wurden nach vier Wochen ausgezählt. Die Anzahl der erhaltenen *Foci* in der Kontrolle mit pcDNA3 wurden als Referenz auf 100 % normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung.

Volllängenprotein wie erwartet die *Focus*-Anzahl auf 48 % des Referenzniveaus reduzierte. Die beiden Deletionsmutanten der BRD7-Interaktionsdomäne wiesen mit 52 bzw. 48 % keinen signifikanten Einfluss auf die Reduktion der *Focus*-Bildung durch E1B-AP5 auf. Ein vergleichbares Ergebnis wurde mit der Proteinisoform E1B-AP5-A, mit 52 % der *Focus*-Anzahl erhalten. Analog wurde die Transformation primärer Zellen durch das zelluläre Onkogen *ras* in Kooperation mit E1A untersucht (Abb. 36). Vergleichbar zum Volllängenprotein mit 15 % zeigten die Deletionsmutanten E1B-AP5 Δ BBS1 und Δ BBS2 eine Reduktion der *Focus*-Anzahl auf 16 bzw. 14 %. Überraschenderweise war E1B-AP5-A im Vergleich zum Volllängenprotein jedoch nur eingeschränkt fähig, mit der *ras*/E1A-vermittelten Transformation primärer Nagetierzellen zu interferieren. Die Expression der Proteinisoform führte zu einer Verringerung der *Focus*-Anzahl auf nur 52 % und war damit um mehr als das Dreifache im Vergleich zum Volllängenprotein E1B-AP5 erhöht.

Aus den erhaltenen Daten der Transformationsexperimente kann gefolgert werden, dass die E1B-AP5-BRD7-Interaktion eine untergeordnete Rolle in der Repression der

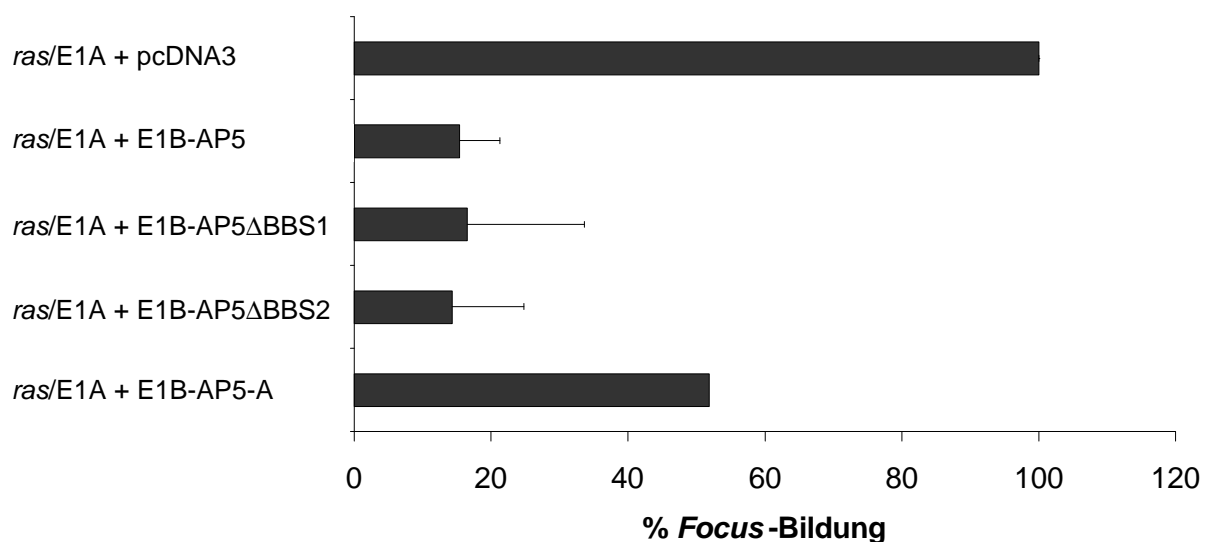


Abb. 36 Inhibition der *ras*/E1A-vermittelten Transformation durch E1B-AP5

Es wurden je 3×10^6 primäre BRK-Zellen (4.2.1.2) mit 1,5 μ g des Plasmids pCMV-E1A-12S sowie 5 μ g EJ-*ras* zusammen mit je 5 μ g der Plasmide pcDNA3, pHA-E1B-AP5, pHA-E1B-AP5 Δ BBS1, pHA-E1B-AP5 Δ BBS2 oder pHA-E1B-AP5-A wie beschrieben transfiziert (4.2.4). Die mit Kristallviolett gefärbten *Foci* wurden nach vier Wochen ausgezählt. Die Anzahl der erhaltenen *Foci* in der Kontrolle mit pcDNA3 wurden als Referenz auf 100 % normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung.

Transformation primärer Nagetierzellen spielt. Die Deletion der BRD7-Wechselwirkungsdomäne zeigte keinen Einfluss auf die transformationsinhibierenden Eigenschaften des E1B-AP5-Proteins. Die E1B-AP5-A-vermittelte Verringerung der *Focus*-Anzahl scheint jedoch vom Kontext der transformierenden Genprodukte abhängig zu sein. Die Transformation primärer Zellen durch die adenoviralen Genprodukte E1A und E1B wurde mit einer zum Volllängenprotein vergleichbaren Effizienz reprimiert. Im Gegensatz dazu zeigte die Proteinisoform E1B-AP5-A nur einen verminderten Einfluss auf die *Focus*-Bildung durch das zelluläre Onkogen *ras* in Verbindung mit E1A. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der aminoternale Bereich des Volllängenproteins E1B-AP5 zusätzliche Funktionen für die Transformationsinhibition zur Verfügung stellt, der in der Proteinisoform E1B-AP5-A jedoch fehlt.

5.3.3 Verringerung des Zellwachstums durch E1B-AP5

Die Resultate der Transformationsversuche zeigten, dass das E1B-AP5-Protein mit der *Focus*-Bildung primärer Zellen durch transformierende Genprodukte interferiert und dass dabei die aminoternale Domäne von E1B-AP5 an diesem Prozess beteiligt ist. Basierend auf dieser Grundlage wurde der Einfluss der E1B-AP5-Überexpression auf das Wachstum von H1299-Zellen in Kultur untersucht. Aufgrund der Beobachtung, dass mit der herkömmlichen Kalziumphosphat-Transfektionsmethode (4.2.3) unter optimalen Bedingungen maximal 25 - 30 % der Zellen erfolgreich transfiziert werden, wurde für die Proliferationsstudien die Lipofektion als Transfektionsmethode (4.2.3.2) gewählt. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Transfektionseffizienz auf mehr als 90 % angehoben wurde. Die Auswertung der Daten ergab (Abb. 37), dass durch die Überexpression des Volllängenproteins E1B-AP5, die Zellzahl fast auf ein Drittel im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen verringert wurde. Im Gegensatz dazu zeigte die transiente Überexpression der Proteinisoform E1B-AP5-A keinen signifikanten Einfluss auf das Zellwachstum.

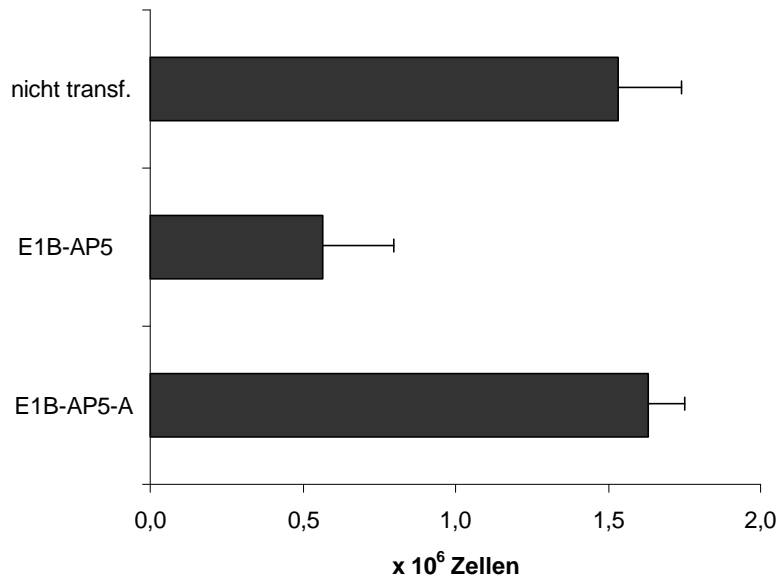


Abb. 37 Einfluss der transienten Überexpression von E1B-AP5 auf das Zellwachstum

Für die Analyse des Einflusses von E1B-AP5 auf das Zellwachstum wurden H1299-Zellen mit je 5 µg der Plasmide pHA-E1B-AP5 und pHA-E1B-AP5-A mittels Lipofektion (4.2.3.2) in 10 cm Zellkulturschalen transfiziert. Nach 48 h wurde die Zellzahl sowohl der transfizierten Ansätze als auch einer nicht transfizierten Kontrolle bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Neben der Verringerung der Zellzahl wurden zusätzlich morphologische Veränderungen der E1B-AP5-überexprimierenden Zellen beobachtet (Abb. 38). Die Kontrollzellen waren deutlich mit der Zellkulturunterlage verbunden und wiesen dadurch eine abgeflachte Form auf. Darüber hinaus konnten eine Reihe mitotischer Zellen identifiziert werden, was auf eine aktive Zellteilung hinweist. Im Gegensatz

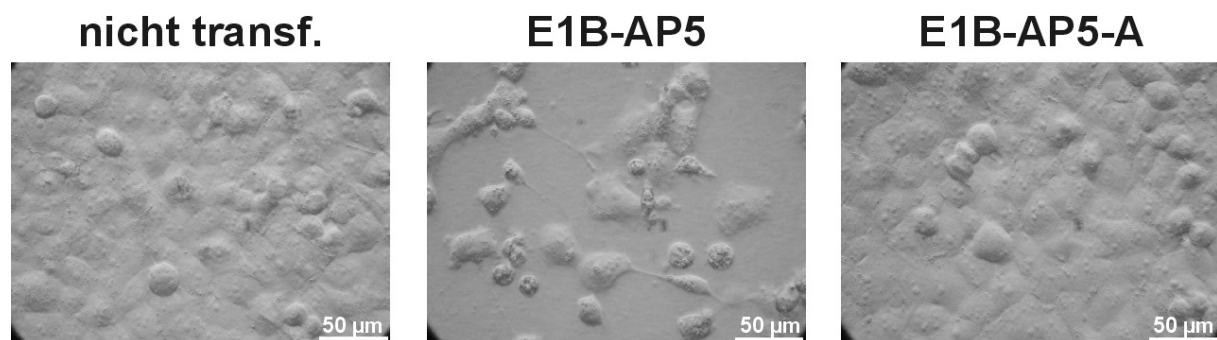


Abb. 38 Morphologischer Vergleich E1B-AP5- und E1B-AP5-A-transfizierter H1299-Zellen

Die morphologischen Bilder zeigen einen Vergleich von nicht transfizierten Kontrollzellen mit transient überexprimierenden pHA-E1B-AP5- oder pHA-E1B-AP5-A-transfizierten H1299-Zellen. Die Varrell-Kontrast-Aufnahmen wurden mit einem inversen Lichtmikroskop (Axiovert 200, Zeiss) unter Verwendung einer Digitalkamera (DSC-75, Sony) gemacht.

dazu zeigten die E1B-AP5-überexprimierenden Zellen eine unregelmäßige Morphologie, wobei auch eine Ablösung von der Zellkulturunterlage zu beobachten war. Außerdem wurden nur sehr vereinzelt mitotische Zellen identifiziert. Die Überexpression der aminoterminal verkürzten Proteinisoform E1B-AP5-A hatte interessanterweise keinen signifikanten Einfluss auf die Morphologie im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen.

Insgesamt lassen die vorliegenden Daten den Schluss zu, dass die transiente Überexpression von E1B-AP5 nicht nur mit initialen Vorgängen der Transformation interferiert, sondern auch das Wachstum etablierter Zelllinien inhibiert. Die Beobachtung, dass die aminoterminal verkürzte Proteinisoform jedoch keinen Einfluss auf das Zellwachstum ausübt deutet darauf hin, dass für die Beteiligung des E1B-AP5-Proteins an der Kontrolle des Zellwachstums die aminoternale Region der Aminosäurereste 1 - 100 essenziell ist.

5.3.4 Western Blot-Analysen zum Nachweis der Isoform E1B-AP5-A

Für die weiterführenden Analysen war es von Interesse, ob die zur Verfügung stehenden monoklonalen Antikörper 6C5 und 4A11 oder das polyklonale Antiserum, welche zum Nachweis des Volllängenproteins E1B-AP5 verwendet werden, die Detektion der Protein-Isoform E1B-AP5-A ermöglichen. Dazu wurden H1299-Zellen mit den Plasmiden pHA-E1B-AP5 und pHA-E1B-AP5-A transfiziert (4.2.3) und die transient überexprimierten, epitopmarkierten Proteinsioformen mittels *Western Blot* analysiert (4.6.8). Die Auswertung der Daten ergab (Abb. 39), dass durch die Verwendung des HA-Epitop-spezifischen monoklonalen Antikörpers (3F10) sowohl das epitopmarkierte Volllängenprotein HA-E1B-AP5, mit einem Molekulargewicht von 112 kDa, als auch die Proteinisoform HA-E1B-AP5-A, mit einem Molekulargewicht von 90 kDa detektiert wurden. Durch die Verwendung der monoklonalen, E1B-AP5-spezifischen Antikörper 6C5 und 4A11 wurde die typische Doppelbande für endogenes E1B-AP5 erhalten, wobei das Signal bei 119 kDa auf eine unspezifische Kreuzreaktion der monoklonalen Antikörper zurückzuführen ist. Eine starke Reaktivität wurde wie erwartet gegen das überexprimierte

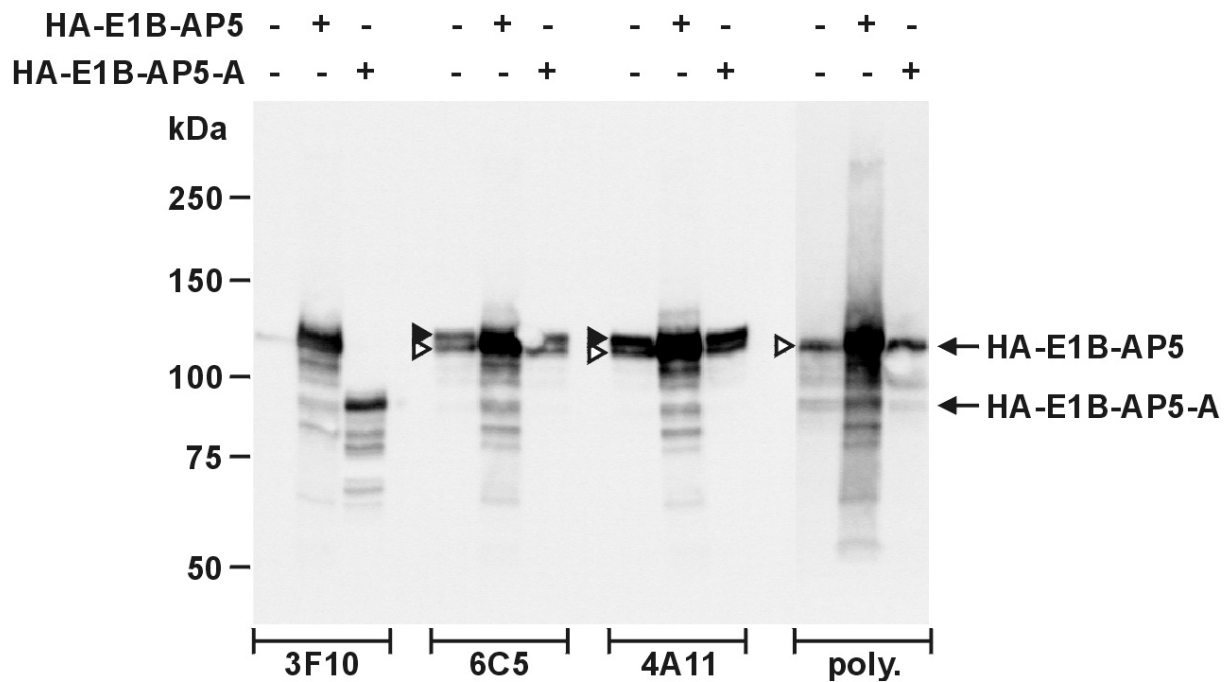


Abb. 39 Western Blot-Analysen zum Nachweis der Isoform E1B-AP5-A

Zur Überprüfung der Antikörpererkennung der Isoform E1B-AP5-A wurden 1×10^6 H1299-Zellen in Zellkulturschalen mit je $5 \mu\text{g}$ der Plasmide pHA-E1B-AP5 oder pHA-E1B-AP5-A mittels Lipofektion (4.2.3.2) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert (4.6.1), die Proteine über ein 6 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (4.6.6) und auf Nitrozellulose-Membranen übertragen (4.6.8.1). Die Detektion erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen das HA-Epitop (3F10; 1 : 1000 verdünnt), sowie mit monoklonalen Antikörpern (6C5, 4A11; beide 1 : 10 verdünnt) und mit einem polyklonalen Serum (poly.; 1 : 800 verdünnt) gegen E1B-AP5. Die monoklonalen Antikörper wurden wiederum mit einem HRP-gekoppelten anti-Ratte-Antikörper, das polyklonale Serum mit einem HRP-gekoppelten anti-Kaninchen-Antikörper (beide 1 : 5000 verdünnt) nachgewiesen (4.6.8.3). Für die Untersuchung mit den 3F10-, 6C5- und 4A11-Antikörpern wurden $50 \mu\text{g}$, für den Nachweis mit dem polyklonalen Antikörper wurden $10 \mu\text{g}$ Gesamtprotein pro Spur verwendet. Die Größen des verwendeten Molekulargewichtsstandards (in kDa) sind angegeben. Die Pfeile markieren Banden, die den E1B-AP5-Proteinisofomen entsprechen. Endogenes E1B-AP5 ist durch weiße Pfeilspitzen, die unspezifische Kreuzreaktion der monoklonalen Antikörper durch schwarze Pfeilspitzen markiert.

Volllängenprotein beobachtet, keine Signale wurden jedoch für die Proteinisoform erhalten. Analog zeigte die Verwendung des polyklonalen Antiserums keine Reaktivität gegen das aminoterminal verkürzte E1B-AP5-A.

Diese Beobachtungen erlauben zum einen die Kartierung des immunogenen Epitops von E1B-AP5 auf den Bereich der Aminosäurereste 1 - 100 des Volllängenproteins, zum anderen ist ein Nachweis der endogenen Proteinisoform E1B-AP5-A mit den bisher zur Verfügung stehenden Antikörpern nicht möglich.

5.4 Untersuchungen zur intranukleären Lokalisation von E1B-AP5

Die Ergebnisse der molekularen Analysen zur Funktion der Proteinisoform E1B-AP5-A zeigten, dass obwohl die bisher identifizierten Funktionsdomänen des Volllängenproteins E1B-AP5 in der Primärstruktur der verkürzten Isoform enthalten sind, die aminotermine Region zusätzliche modulatorische Eigenschaften aufweist. Aufgrund der differentiellen Expression des Volllängenproteins und des aminoterminal verkürzten Polypeptids E1B-AP5-A scheint die Funktion von E1B-AP5 auch auf zellulärer Ebene über den aminoterminalen Bereich moduliert zu werden. Interessanterweise kann in dieser Region im Bereich der Aminosäurereste 3 - 37 die bereits erwähnte SAP-Domäne identifiziert werden, welche eine Identität von 64 % mit einer Homologie von 87 % zur SAP-Domäne (Synonym SAF-Box) des hnRN-Proteins SAF-A aufweist (Abb. 40). Das SAF-A-Polypeptid vermittelt als Hauptbestandteil der nukleären Matrix die Organisation chromosomaler DNA in hochgeordnete Strukturen im Zellkern (Romig *et al.*, 1992). Untersuchungen zur molekularen Grundlage dieser Funktion von SAF-A ergaben, dass die SAP-Domäne spezifische Interaktionen mit S/MAR-Elementen chromosomaler DNA eingeht und mit dem Proteingrundgerüst der nukleären Matrix verbindet (Kipp *et al.*, 2000). Basierend auf den sowohl strukturellen als auch funktionellen Homologien des E1B-AP5-Proteins zum SAF-A-Polypeptid, stellte sich die Frage ob E1B-AP5 ebenso ein Bestandteil der nukleären Matrix ist.

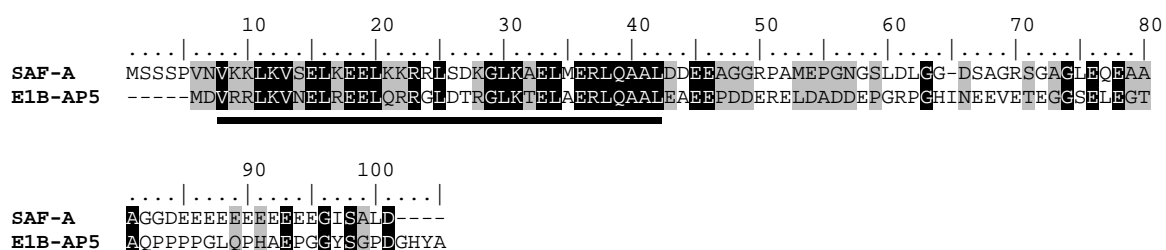


Abb. 40 Vergleich der SAP-Domänen von SAF-A und E1B-AP5

Dargestellt ist der Vergleich der Aminosäurereste 1 - 100 der Primärstruktur von SAF-A und E1B-AP5. Auffallend ist die Homologie im konservierten Bereich der SAP-Domäne (unterstrichen).

5.4.1 Fraktionierter Zellaufschluss zur Untersuchung der intranukleären Lokalisation von E1B-AP5

Unter dem Begriff nukleäre Matrix ist ein Komplex aus Proteinen, darunter fast alle hnRN-Proteine, und heterogener nukleärer RNA (hnRNA) zusammengefasst, welche an der strukturellen Organisation des Zellkerns in funktionelle Kompartimente maßgeblich beteiligt sind (zur Übersicht: Nickerson, 2001). Methodisch ist die nukleäre Matrix definiert als unlösliche Struktur, die nach Abtrennung von Chromatin und löslicher, nukleärer Proteine verbleibt (Berezney und Coffey, 1974). Zur Untersuchung der Matrixassoziation von endogenem E1B-AP5 wurde deshalb ein Protokoll verwendet (4.6.2), welches die sequenzielle Abtrennung löslicher Proteinbestandteile beinhaltet und letztendlich zur Präparation der nukleären Matrix führt (Fey *et al.*, 1984; Spector *et al.*, 1998). Dabei wurden zunächst zytoplasmatische Proteine (Zp) von den intakten Zellkernen abgetrennt. Im weiteren Verlauf wurden lösliche, nukleoplasmatische (Np) und leicht extrahierbare, chromatinassoziierte Proteine, wie zum Beispiel Histon H1 (H1) gewonnen. Durch den Abbau genomischer DNA wurden die Proteinbestandteile des Chromatins erhalten (Ch). Die verbliebene unlösliche nukleäre Matrix (Ma) wurde schließlich durch die Resuspension mit Lysepuffer solubilisiert. Parallel wurde ein Gesamtzellextrakt (Ri) durch direkte Lyse (4.6.1) der Zellen hergestellt. Die Proteine der erhaltenen Fraktionen wurden daraufhin mittels *Western Blot* analysiert (4.6.8). Die Auswertung der Daten ergab (Abb. 41), dass in den löslichen Fraktionen Zp und Np kein E1B-AP5 nachzuweisen war. Im Gegensatz dazu wurden in den subnukleären Fraktionen H1, Ch und Ma deutliche Signale mit dem E1B-AP5-spezifischen Antikörper erhalten. Dabei wurden interessanterweise hinsichtlich des Laufverhaltens im SDS-Polyacrylamidgel zwei unterscheidbare Formen von E1B-AP5 detektiert, was auf unterschiedliche posttranslationale Modifikationen hindeutet. Die Analyse des Gesamtzellextrakts ergab, dass im Vergleich zu den subnukleären Fraktionen nur geringe Mengen E1B-AP5 enthalten waren und vermutlich bei der Präparation als unlösliches Sediment verworfen wurde.

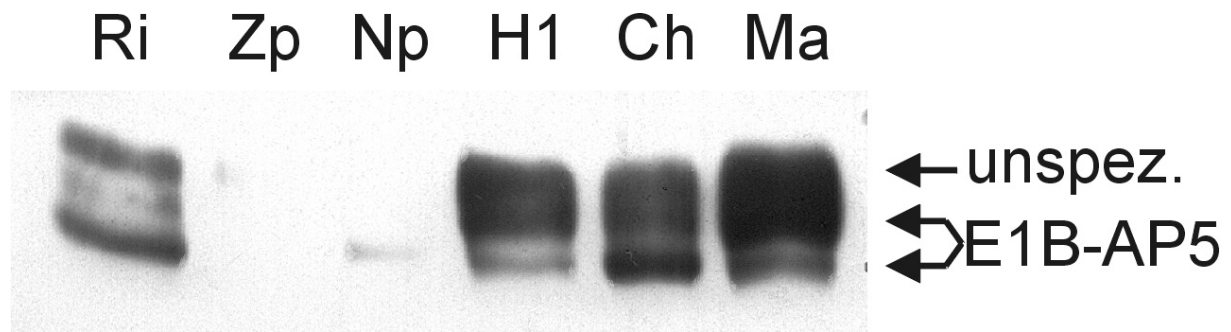


Abb. 41 Western Blot-Analysen der zytoplasmatischen und subnukleären Lokalisation von E1B-AP5

Zur Analyse der Matrixassoziation von E1B-AP5 wurde ein fraktionierter Zellaufschluss von MCF7-Zellen durchgeführt (4.6.2). Nach Abtrennung des Zytoplasmas (Zp) wurde zunächst die nukleoplasmatische Fraktion löslicher Proteine gewonnen (Np). Es folgte sequenziell die Extraktion chromatinassoziierter Proteine zunächst durch niedrige Salzkonzentration (H1) und anschließend, nach Spalten der genomischen DNA mit DNase I, durch Extraktion mit hoher Salzkonzentration (Ch). Die verbleibende nukleäre Matrix (Ma) wurde in Lysepuffer gelöst. Parallel wurde ein Gesamtzellextrakt (Ri) durch direkte Lyse der Zellen mit RIPA-Puffer hergestellt (4.6.1). Je 50 µg der einzelnen Fraktionen wurden mittels eines 6 %igen SDS-Polyacrylamidgels aufgetrennt (4.6.6). Nach Transfer der Proteine auf Nitrozellulose-Membranen (4.6.8.1) wurde endogenes E1B-AP5 mit dem monoklonalen Antikörper 6C5 (1 : 10 verdünnt) detektiert, welcher wiederum durch einen HRP-markierten anti-Ratte-Antikörper (1 : 5000 verdünnt) nachgewiesen wurde (4.6.8.3). Die unspezifische Bande sowie die E1B-AP5-spezifischen Banden sind durch Pfeile markiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das E1B-AP5-Protein hauptsächlich in den subnukleären Strukturen des Chromatins und der nukleären Matrix lokalisiert ist. Zusätzlich deuten die Ergebnisse an, dass chromatinassoziertes E1B-AP5 im Vergleich zum matrixassozierten Protein unterschiedliche posttranslationale Modifikationen aufweist, welche möglicherweise die Lokalisation in den subnukleären Kompartimenten beeinflusst.

5.4.2 In-situ-Untersuchungen zur intranukleären Lokalisation von E1B-AP5

Die Ergebnisse des fraktionierten Zellaufschlusses zeigten, dass das E1B-AP5-Polypeptid als neues matrixassoziertes Protein identifiziert wurde. Hinsichtlich der weiteren Charakterisierung der intranukleären Lokalisation von E1B-AP5 wurden In-situ-Untersuchungen von H1299-Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz (4.7) durchgeführt. Analog zur Fraktionierung für *Western Blot*-Analysen wurden bei der In-situ-Präparation nukleärer Matrix (4.7.2) lösliche zytoplasmatische und nukleäre Proteine von der unlöslichen Fraktion der nukleären Matrix abgetrennt. Parallel

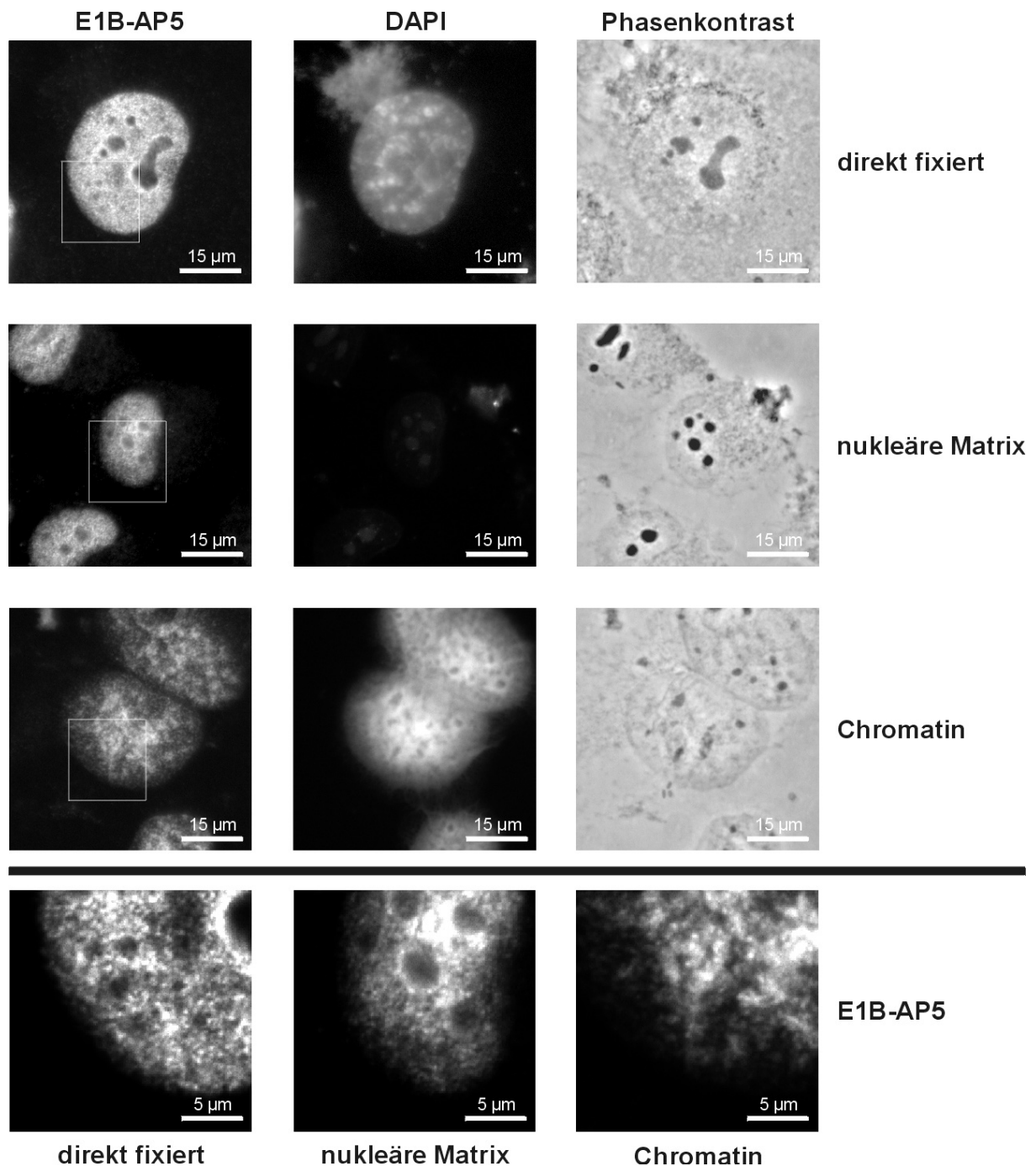


Abb. 42 In-situ-Untersuchungen zur intranukleären Lokalisation von E1B-AP5

H1299-Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät und entweder direkt fixiert (4.7.1) oder die nukleäre Matrix bzw. das Chromatin präpariert (4.7.2). Das endogene E1B-AP5-Polypeptid wurde mit dem polyklonalen Antiserum (1 : 800 verdünnt) nachgewiesen, welches wiederum mit einem FITC-markierten anti-Kaninchen-Antikörper (1 : 250 verdünnt) detektiert wurde (4.7.3). Die chromosomale DNA wurde mit DAPI gefärbt (0,2 µg/ml). Der Bereich der unten dargestellten Ausschnittsvergrößerungen der E1B-AP5-Aufnahmen sind durch weiß umrandete Quadrate markiert. Zur Verdeutlichung der nukleären Verteilungsmuster in den Ausschnittsvergrößerungen wurden die Ober- und Untergrenzen der Helligkeitsskala sowie der Gamma-Wert angepasst. Der Maßstab ist jeweils angegeben.

wurden zur Untersuchung der Chromatinassoziation von E1B-AP5 die Proteine der nukleären Matrix durch RNase-Behandlung extrahiert (4.7.2; Ma *et al.*, 1999). Zum Vergleich wurden Zellen direkt fixiert (4.7.1). Die Auswertung der Immunfluoreszenz-Daten zeigte (Abb. 42), dass das E1B-AP5-Polypeptid in einem sehr feinen punktförmigen Muster im Zellkern organisiert vorliegt, wie es für hnRN-Proteine kennzeichnend ist (Mattern *et al.*, 1999), wobei die Nukleoli ausgespart sind. Dieses Muster wurde sowohl in direkt fixierten Zellen, als auch in der nukleären Matrix und im Chromatin detektiert. Dieses Ergebnis bestätigte die Daten des fraktionierten Zellaufschlusses, dass das E1B-AP5-Protein sowohl mit Chromatin assoziiert ist als auch in der nukleären Matrix vorliegt. Die Ähnlichkeit des Chromatinmusters mit der Verteilung in der nukleären Matrix lässt außerdem den Schluss zu, dass E1B-AP5 zumindest teilweise eine Verbindung von chromosomaler DNA zur nukleären Matrix vermittelt.

5.4.3 Mutationsanalyse der intranukleären Lokalisation von E1B-AP5

Die Beobachtung, dass E1B-AP5 sowohl mit Chromatin als auch mit der nukleären Matrix assoziiert ist führten zur Überlegung, welchen Einfluss die in dieser Arbeit identifizierte BRD7-Wechselwirkung auf die intranukleäre Lokalisation ausübt. Darüber hinaus war es von Interesse ob die Deletion der aminoterminalen SAP-Domäne der Proteinsisoform E1B-AP5-A das nukleäre Verteilungsmuster beeinflusst. Basierend auf dieser Grundlage wurde die intranukleäre Lokalisation der HA-Epitop-markierten E1B-AP5 Δ BBS2- und E1B-AP5-A-Polypeptide im Vergleich zum Vollängenprotein mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Die Auswertung der Daten ergab, dass die Verteilung des HA-Epitop-markierten Vollängenproteins abhängig vom Grad der Überexpression in den transfizierten Zellen war (Abb. 43). Die starke Überexpression von HA-E1B-AP5 führte zur Auflösung des feinen punktförmigen nukleären Musters wobei eine Akkumulation in grössere Proteinaggregate beobachtet wurde. Damit einhergehend war eine deutliche Morphologieveränderung sowohl der Zellen als auch des Zellkerns zu erkennen. Schwach überexprimierende Zellen zeigten im Gegensatz dazu keinen

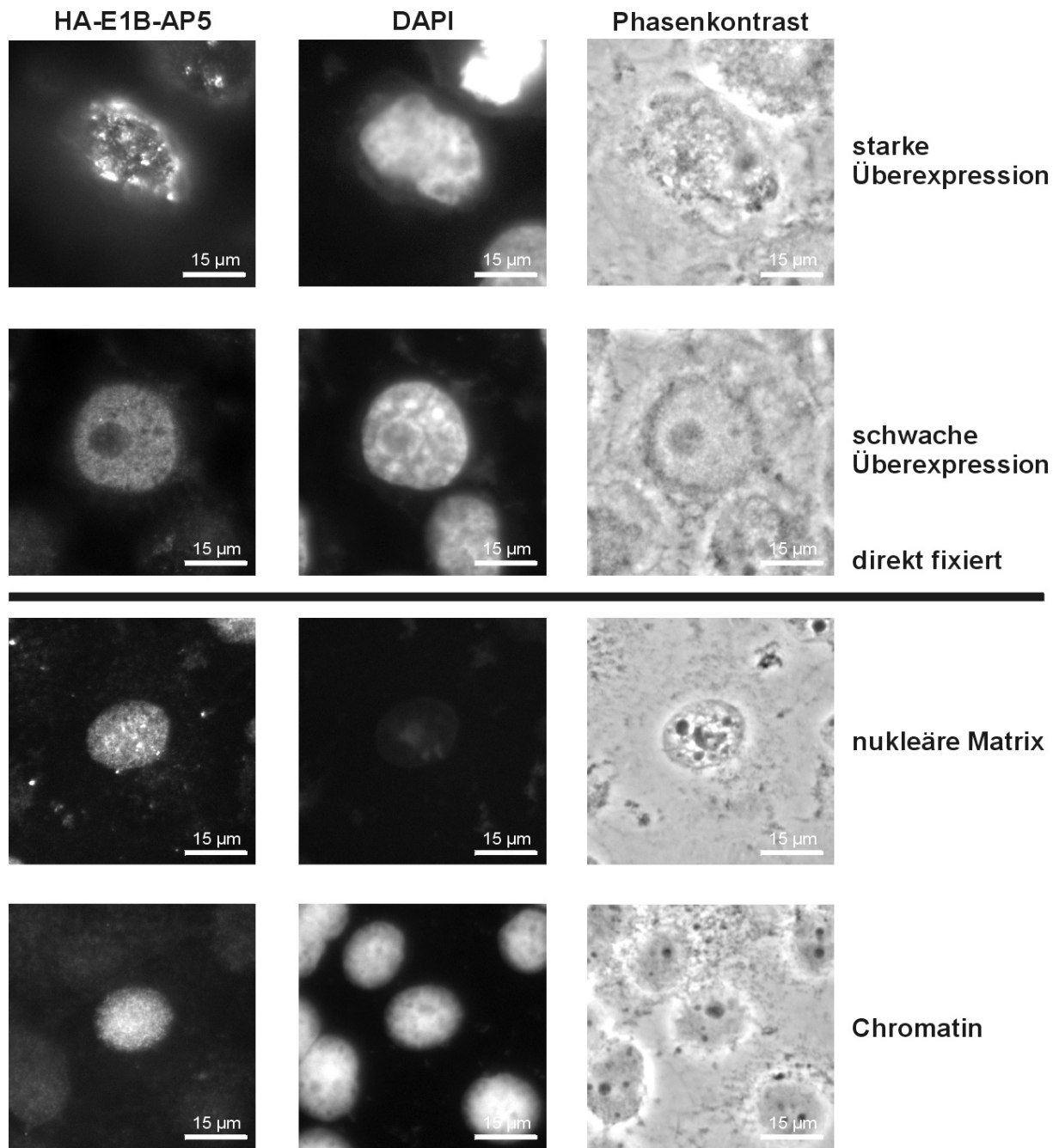


Abb. 43 In-situ-Untersuchungen zur intranukleären Lokalisation von HA-E1B-AP5

H1299-Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät und mit 0,25 µg des Plasmids pHA-E1B-AP5 mittels Lipofektion transfiziert (4.2.3.2). Die Zellen wurden entweder direkt fixiert (4.7.1) oder die nukleäre Matrix bzw. das Chromatin präpariert (4.7.2). Das überexprimierte HA-E1B-AP5-Polypeptid wurde mit dem monoklonalen anti-HA-Antikörper (1 : 500 verdünnt) nachgewiesen, welches wiederum mit einem *Texas Red*-markierten anti-Ratte-Antikörper (1 : 250 verdünnt) detektiert wurde (4.7.3). Die chromosomale DNA wurde mit DAPI gefärbt (0,2 µg/ml). Der Maßstab ist jeweils angegeben.

signifikanten Unterschied in der intranukleären Lokalisation im Vergleich zum endogenen E1B-AP5, was die punktförmige Verteilung im Chromatin und in der nukleären Matrix einschloss. Ein vergleichbares Ergebnis wurde bei der

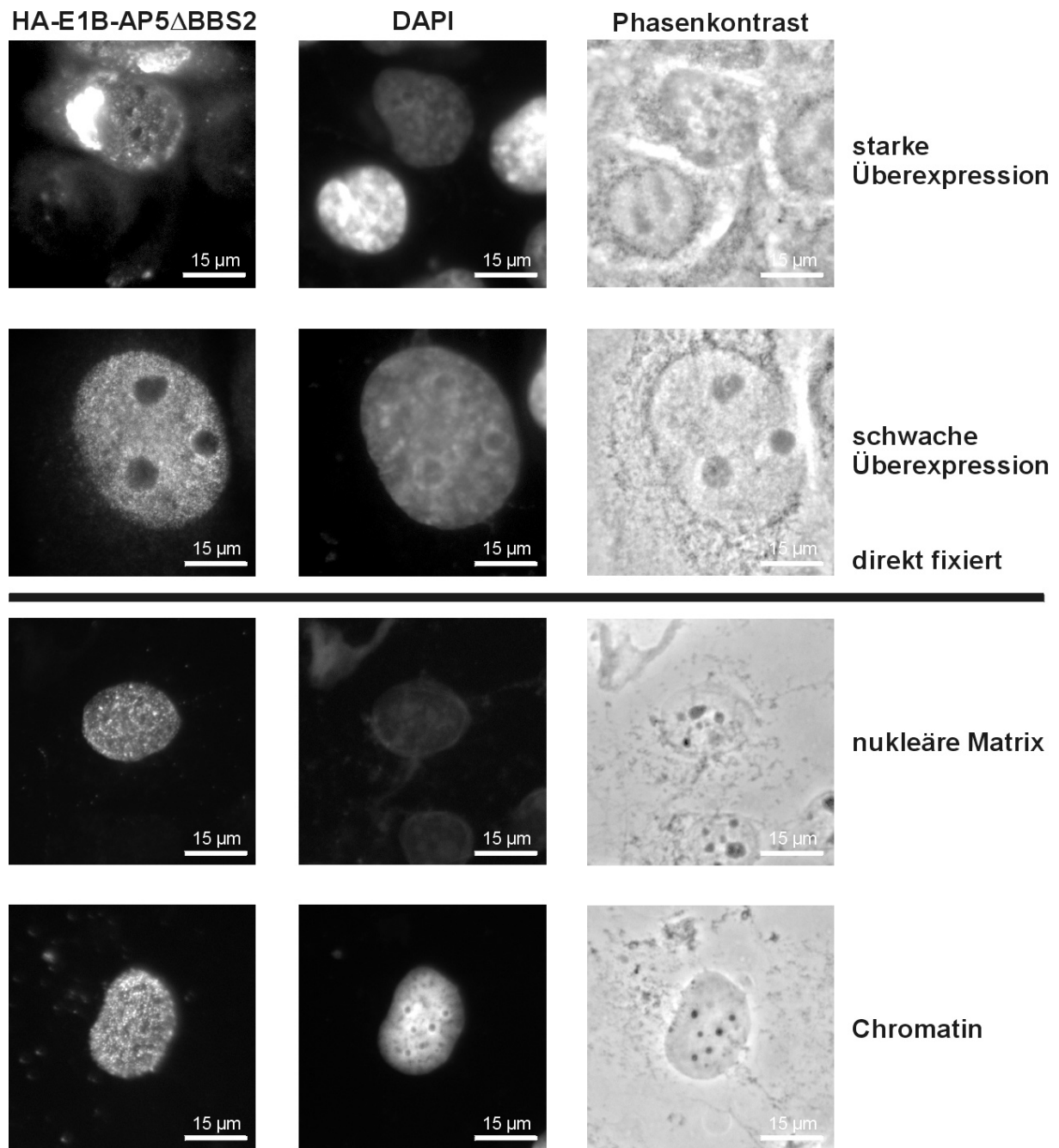


Abb. 44 In-situ-Untersuchungen zur intranukleären Lokalisation von HA-E1B-AP5 Δ BBS2

H1299-Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät und mit 0,25 μ g des Plasmids pHA-E1B-AP5 Δ BBS2 mittels Lipofektion transfiziert (4.2.3.2). Die Zellen wurden entweder direkt fixiert (4.7.1) oder die nukleäre Matrix bzw. das Chromatin präpariert (4.7.2). Das überexprimierte HA-E1B-AP5 Δ BBS2-Polypeptid wurde mit dem monoklonalen anti-HA-Antikörper (1 : 500 verdünnt) nachgewiesen, welches wiederum mit einem *Texas Red*-markierten anti-Ratte-Antikörper (1 : 250 verdünnt) detektiert wurde (4.7.3). Die chromosomale DNA wurde mit DAPI gefärbt (0,2 μ g/ml). Der Maßstab ist jeweils angegeben.

Untersuchung der Deletionsmutante der BRD7-Interaktionsdomäne erhalten (Abb. 44), wobei die Veränderungen der zellulären Morphologie in stark überexprimierenden Zellen jedoch weniger ausgeprägt war. Im Gegensatz dazu

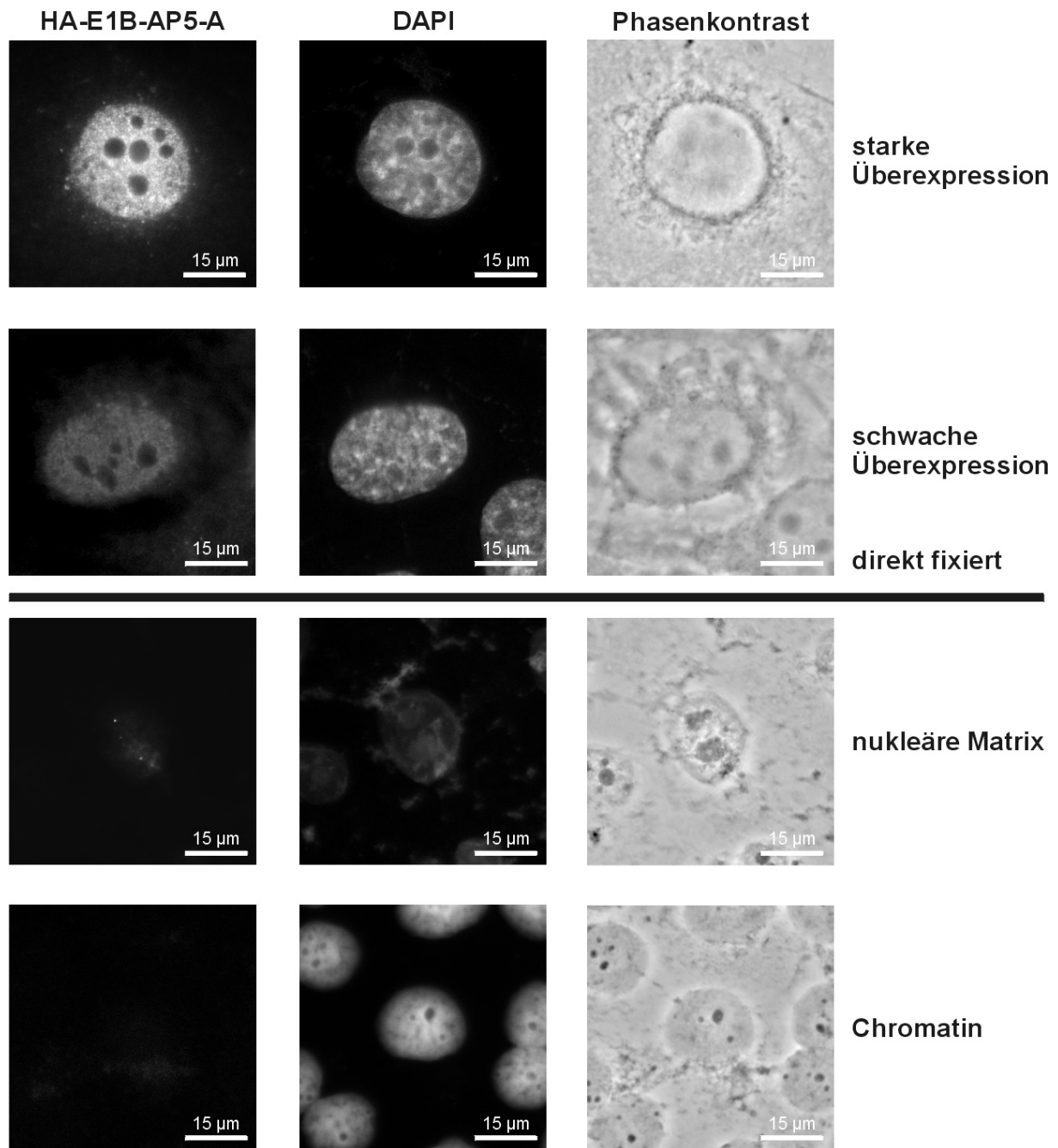


Abb. 45 In-situ-Untersuchungen zur intranukleären Lokalisation von HA-E1B-AP5-A

H1299-Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät und mit 0,25 µg des Plasmids pHA-E1B-AP5-A mittels Lipofektion transfiziert (4.2.3.2). Die Zellen wurden entweder direkt fixiert (4.7.1) oder die nukleäre Matrix bzw. das Chromatin präpariert (4.7.2). Das überexprimierte HA-E1B-AP5-A-Polypeptid wurde mit dem monoklonalen anti-HA-Antikörper (1 : 500 verdünnt) nachgewiesen, welches wiederum mit einem *Texas Red*-markierten anti-Ratte-Antikörper (1 : 250 verdünnt) detektiert wurde (4.7.3). Die chromosomale DNA wurde mit DAPI gefärbt (0,2 µg/ml). Der Maßstab ist jeweils angegeben.

zeigte die Verteilung der Proteinisoform E1B-AP5-A keine signifikante Abhängigkeit vom Grad der Überexpression (Abb. 45). In direkt fixierten Zellen wurde ein zum endogenen E1B-AP5 vergleichbares nukleäres, punktförmiges Muster detektiert. Interessanterweise wurde jedoch in den subnukleären Kompartimenten des

Chromatins und der nukleären Matrix kein Signal für die HA-Epitop-markierte Proteinisoform erhalten. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die Deletion der aminoterminalen Region zwar keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation des E1B-AP5-Proteins ausübt, die intranukleäre Verteilung aber maßgeblich beeinflusst. Der Verlust der Chromatinassoziation der aminoterminal verkürzten Proteinisoform E1B-AP5-A steht im Einklang mit der Hypothese, dass die SAP-Homologiedomäne des Vollängenproteins die Wechselwirkung mit chromosomaler DNA vermittelt. Zusätzlich scheint über die Chromatinwechselwirkung auch die Assoziation von E1B-AP5 mit der nukleären Matrix reguliert zu werden. Diese Beobachtung deutet auf funktionelle Unterschiede der beiden E1B-AP5-Proteinisoformen hin, welche durch die differenzielle Synthese der alternativen Transkripte auf zellulärer Ebene reguliert werden.

5.4.4 Intranukleäre Umstrukturierung von E1B-AP5 im Verlauf des lytischen Infektionszyklus von Adenovirus Serotyp 5

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Matrixassoziation von E1B-AP5 verdeutlichen, dass dessen Funktion unter anderem durch die intranukleäre Verteilung moduliert wird. Die Beobachtungen von Gabler und Mitarbeitern (Gabler *et al.*, 1998), die auf eine Beteiligung von E1B-AP5 am zellulären RNA-Metabolismus hindeuteten, führten zur Überlegung, ob dessen funktionelle Modulation im Zuge des *host shut-off* durch eine intranukleäre Umstrukturierung während des Infektionszyklus vermittelt wird. Zur Aufklärung dieser Fragestellung wurde die nukleäre Verteilung von E1B-AP5 im zeitlichen Verlauf des lytischen Infektionszyklus von Ad5 untersucht. Dazu wurden A549-Zellen mit dem funktionellen Wildtypvirus H5dl309 mit einer *multiplicity of infection* (moi) von 40 *fluorescence forming units* (ffu) pro Zelle infiziert (4.3) und die nukleäre Verteilung von endogenem E1B-AP5 mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht (4.7). Die Auswertung der Daten ergab (Abb. 46), dass 12 Stunden nach Infektion eine beginnende Umstrukturierung des nukleären E1B-AP5 beobachtet wurde, welche im weiteren Verlauf zu einem vollständigen Verlust der normalen, punktförmigen Verteilung führte. Auffallend waren die zu detektierenden Aussparungen der

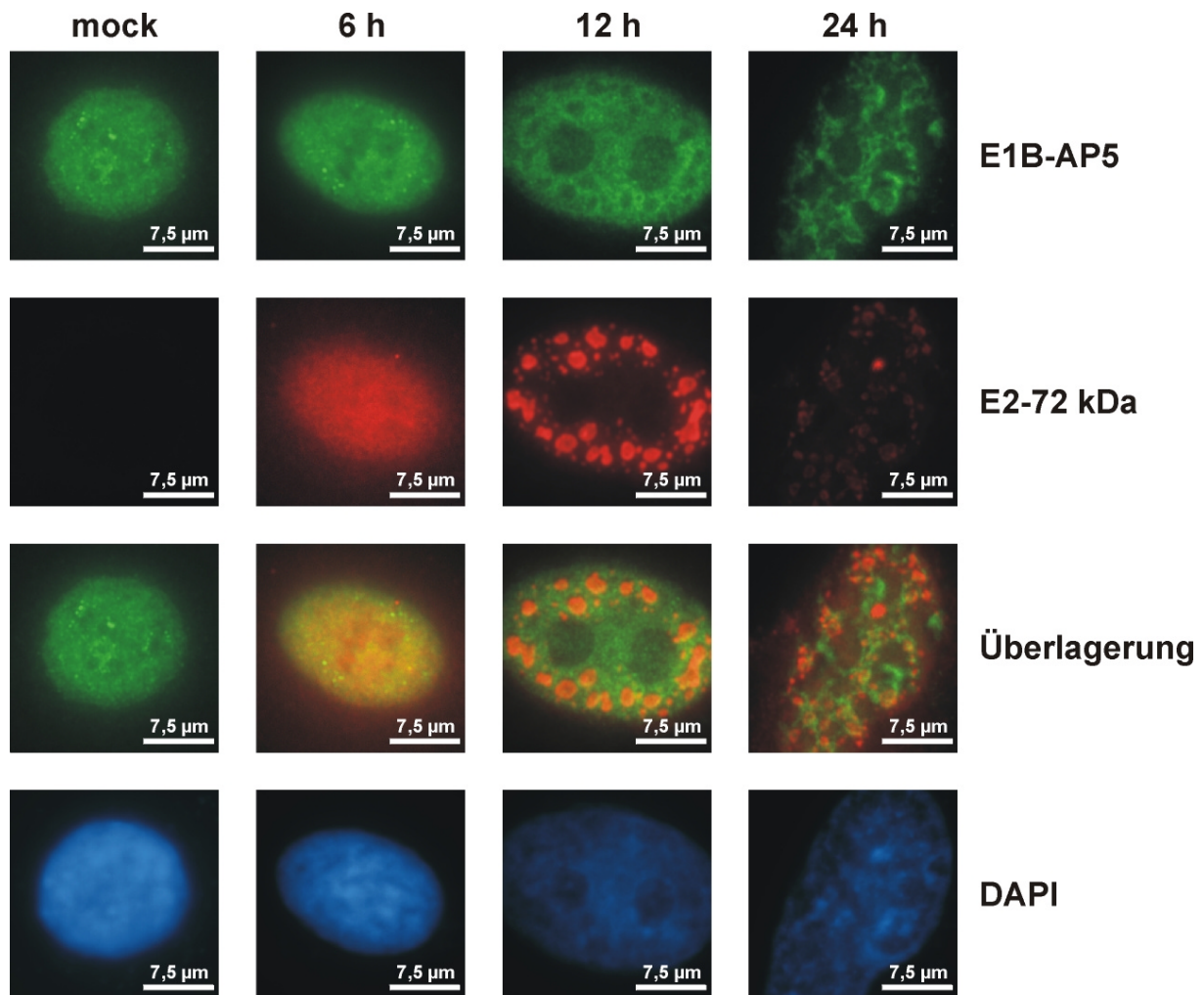


Abb. 46 Nukleäre Verteilung von E1B-AP5 während der lytischen Replikation von Ad5

Zur Untersuchung der nukleären Verteilung des E1B-AP5-Proteins während der lytischen Infektion von Adenovirus Serotyp 5 wurden $2,5 \times 10^5$ A549-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und mit einer moi von 40 infiziert (4.3). Zu den angegebenen Zeitpunkten (in Stunden) wurden die Zellen fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert (4.7). Zur Detektion von endogenem E1B-AP5 wurde das polyklonale Antiserum (1 : 800 verdünnt) verwendet, welches wiederum mit einem FITC-markierten anti-Kaninchen-Antikörper (1 : 250 verdünnt) nachgewiesen wurde. Für den Nachweis der adenoviralen Replikationszentren wurde das E2-72 kDa-Protein mit dem monoklonalen Antikörper B6-8 (1 : 10 verdünnt) nachgewiesen, welcher wiederum durch einen *Texas Red*-gekoppelten anti-Maus-Antikörper detektiert wurde (1 : 250 verdünnt). Die DNA wurde mit 0,2 µg/ml DAPI angefärbt. Der Maßstab ist angegeben. mock: nicht infizierte Zellen.

viralen Replikationszentren, wobei das E1B-AP5-Protein aber in deren direkter Umgebung lokalisiert. Insgesamt zeigen diese Daten, dass das E1B-AP5-Protein während des adenoviralen Replikationszyklus aus der normalerweise vorherrschenden punktförmigen Verteilung in die direkte Umgebung der viralen Replikationszentren relokalisiert wird. Zusammen mit den Daten zur intranukleären Verteilung (5.4.2) stehen diese Ergebnisse im Einklang mit der Hypothese, dass die

funktionellen Eigenschaften von E1B-AP5 durch die Lokalisation in nukleäre Subkompartimente moduliert werden.

6 DISKUSSION

6.1 E1B-AP5 als Kofaktor der mRNA-Synthese

Die eukaryontische Genexpression beruht auf der Funktion einer Reihe von Multiproteinkomplexen, welche die verschiedenen Schritte der Transkription, Prozessierung der Prä-mRNA, den Export reifer mRNA in das Zytoplasma und die Translation der genetischen Information in Polypeptide vermitteln (zur Übersicht: Alberts *et al.*, 1997). Obwohl einzelne Prozesse unabhängig ablaufen können, zeigen neueste Untersuchungen, dass die Synthese reifer mRNA durch vielfältige Wechselwirkungen der beteiligten Faktoren in einem funktionellen und regulatorischen Netzwerk eingebunden ist (zur Übersicht: Maniatis und Reed, 2002). Aktuellen Modellvorstellungen zur Folge koordiniert das aus zwölf Untereinheiten bestehende RNA-Polymerase II-Enzym (RNA-Pol II) im Zentrum dieses Netzwerkes die ablaufenden Reaktionen der Transkription, die 5' und 3' Prozessierung sowie das Spleißen der naszierenden Prä-mRNA (zur Übersicht: Hirose und Manley, 2000). Unabhängig von der Komplexität des RNA-Pol II-Enzyms sind weitere Faktoren für die Regulation der Initiation, Elongation und Termination der Transkription notwendig. Dabei vermitteln generelle Transkriptionsfaktoren (GTF) das Erkennen, und die Bindung des RNA-Pol II-Enzyms an Promotor-Kernelemente, wie beispielsweise die TATA-Box oder die Initiator-Region sowie dessen Ablösung aus dem Präinitiationskomplex im Verlauf der fortschreitenden RNA-Synthese (zur Übersicht: Maldonado und Reinberg, 1995). Zusätzliche spezifische Transkriptionsaktivatoren/-repressoren ermöglichen die Feinregulation der Genexpression durch die Förderung/Hemmung der basalen Transkriptionsmaschinerie (Ptashne und Gann, 1997) und/oder durch die direkte Konformationsänderung verschiedener GTF oder der DNA-Struktur im Promotorbereich eukaryontischer Gene (Roberts und Green, 1994; Chi und Carey, 1996). Zusätzlich zeigen neuere Untersuchungen, dass einige genspezifische Faktoren die Ablösung des RNA-Pol II-Enzyms aus dem Initiationskomplex fördern (Sandaltzopoulos und Becker, 1998) und damit zur effizienten RNA-Synthese beitragen.

6.1.1 Beteiligung von E1B-AP5 an den initialen Vorgängen der Transkription

Im Zentrum der initialen Vorgänge der Transkription höherer Eukaryonten steht das RNA-Pol II-Enzym, deren größte Untereinheit sich durch eine einzigartige carboxyterminale Region, die carboxyterminale Domäne (CTD), auszeichnet (zur Übersicht: Corden, 1990). In Säugetieren besteht die CTD aus 52 Wiederholungen des Heptapeptids Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser und unterliegt während den verschiedenen Phasen der Transkription einer Reihe reversibler, sequenzieller Phosphorylierungen, die zur Bildung der hyperphosphorylierten, prozessiven Form der RNA-Pol II (RNA-Pol IIO) führen (zur Übersicht: Dahmus, 1996; Majello und Napolitano, 2001). Der allgemein anerkannten Modellvorstellung zu den Prozessen der Initiation der Transkription zur Folge kann jedoch nur die nicht phosphorylierte Form der RNA-Pol II (RNA-Pol IIA) zusammen mit den generellen Transkriptionsfaktoren den Präinitiationskomplex ausbilden, welcher eine Grundvoraussetzung für die effiziente RNA-Synthese ist (zur Übersicht: Carlson, 1997).

Die Bedeutung der regulierten Phosphorylierung der CTD *in vivo* wird durch die Beobachtung unterstrichen, dass die Reassoziierung gereinigter Komponenten des Präinitiationskomplexes eine prozessive RNA-Synthese *in vitro* vermitteln, aus nukleären Präparationen stammende Präinitiationskomplexe jedoch eine inhärent abortive RNA-Synthese aufweisen. Dieser Befund führte zu der Modellvorstellung, dass Elongations-Inhibitoren *in vivo* mit dem Präinitiationskomplex assoziiert vorliegen und die vorzeitige Hyperphosphorylierung der RNA-Pol IIA verhindern (Marshall und Price, 1992; Krumm *et al.*, 1995; Xie und Price, 1997).

In diesem Zusammenhang wurde das hnRN-Protein SAF-A identifiziert, dessen transiente Überexpression eine starke Repression der basalen Aktivität verschiedener Promotoren verursacht, was die Elongations-Inhibition im Reporter-gen-System widerspiegelt (Kim und Nikodem, 1999). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals, dass die transiente Überexpression des E1B-AP5-Proteins einen vergleichbaren Effekt auf die basale Aktivität einer Reihe viraler und zellulärer Promotoren aufweist (5.1.1.1). Die Analyse verschiedener E1B-AP5-Mutanten ergab, dass carboxyterminale Deletionen keinen Einfluss auf die Verringerung der basalen

Aktivität verschiedener Promotoren verursachen (5.1.1.2). Dadurch kann diese Funktion des E1B-AP5-Proteins auf die aminoternale Hälfte des Polypeptids kartiert werden. Interessanterweise ist in diesem Bereich (AS 191-460) eine 82 %ige Homologie zur repressorischen Domäne des SAF-A-Polypeptids zu identifizieren. Tatsächlich zeigen die Ergebnisse der transienten Überexpression der isolierten repressorischen Domäne sowohl von SAF-A (Kim und Nikodem, 1999) als auch von E1B-AP5 (5.1.1.2), dass diese für die Verringerung der basalen Promotoraktivität im transienten Reporter-System ausreichend ist. Diese Daten lassen auf vergleichbare molekulare Grundlagen der repressorischen Funktion beider Proteine schließen.

Detaillierte In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen zum Mechanismus der SAF-A-vermittelten Repression basaler Promotoraktivität ergaben, dass die repressorische Domäne von SAF-A spezifisch die Kinase-Aktivität der *cyclin dependent kinase 7* (CDK7)-Untereinheit des generellen Transkriptionsfaktors TFIID inhibiert (Kim und Nikodem, 1999), welcher ein integraler Bestandteil des Präinitiationskomplexes ist (Lu *et al.*, 1992; Hengartner *et al.*, 1998). Die CDK7-Kinase bewirkt die spezifische Phosphorylierung der Serinreste an Position fünf des Heptapeptids der CTD und ist Auslöser der weiteren Prozesse, in deren Verlauf die hyperphosphorylierte RNA-Pol II die prozessive RNA-Synthese vermittelt und viele der kotranskriptionell ablaufenden Prozessierungsschritte koordiniert (zur Übersicht: Maniatis und Reed, 2002). Die beobachtete Verringerung der basalen Aktivität verschiedener Promotoren durch die transiente Überexpression sowohl von SAF-A als auch von E1B-AP5 stehen im Einklang mit der Hypothese, dass beide Proteine an der CDK7-vermittelten Modulation der initialen Vorgänge der Transkription beteiligt sind.

Da dieses Modell die Regulation der RNA-Pol II-Aktivität über die CTD voraussetzt, sollte für die Aktivität CTD-unabhängiger Promotoren jedoch keine Verringerung durch die transiente Überexpression von E1B-AP5 zu erwarten sein. Die Beobachtung, dass die CMV-Promotor-regulierten, internen Kontrollplasmide der Luziferase-Versuche keine signifikante Aktivitätsänderung aufwiesen (Daten nicht gezeigt), scheinen diese Überlegung zu bestätigen, da die Transkriptionsinitiation im

Kontext des CMV-Promotors unabhängig von der CTD des RNA-Pol II-Enzyms reguliert wird (Buermeyer *et al.*, 1992). Diese Beobachtung unterstützt die Modellvorstellung, dass E1B-AP5 analog zu SAF-A spezifisch die Kinase-Aktivität der CDK7-Untereinheit von TFIIF in den frühen Phasen der Transkription kontrolliert und als Kofaktor im Präinitiationskomplex eine vorzeitige Phosphorylierung der CTD des RNA-Pol II-Enzyms verhindert.

6.1.2 Einfluss von E1B-AP5 auf die Glucocorticoid-vermittelte Transkriptionsregulation

Die Ergebnisse zur Regulation der Transkriptionsinitiation lassen auf strukturelle und funktionelle Homologien des E1B-AP5-Proteins zum SAF-A-Polypeptid schließen (5.1.1, 6.1.1). Deshalb war es von Interesse ob E1B-AP5 auch auf anderen funktionellen Ebenen zu SAF-A vergleichbare Eigenschaften aufweist. Basierend auf dieser Überlegung wurde der Einfluss von E1B-AP5 auf die Aktivierung hormonregulierter Promotoren untersucht, da gezeigt wurde, dass SAF-A die Glucocorticoid-vermittelte Transaktivierung von Reporter-gen-Plasmiden beeinflusst (Eggert *et al.*, 1997; Eggert *et al.*, 2001).

In Übereinstimmung mit der allgemeinen Modellvorstellung zur Regulation hormoninduzierter Genexpression, führt die Bindung von Glucocorticoiden an entsprechende Rezeptoren zu deren Translokation aus dem Zytoplasma in den Zellkern wodurch über die Wechselwirkung mit palindromischen DNA-Sequenzen die Transaktivierung der Zielgene vermittelt wird (zur Übersicht: Beato *et al.*, 1995; Eggert *et al.*, 1995; Mangelsdorf *et al.*, 1995). Basierend auf der Grundlage, dass Steroidhormon-Rezeptoren unter anderem mit der nukleären Matrix assoziiert vorliegen (Barrack, 1987), wurde SAF-A, ein Hauptbestandteil der nukleären Matrix, als Glucocorticoid-Rezeptor-assoziertes Protein identifiziert (Eggert *et al.*, 1997). Dabei wurde gezeigt, dass die transiente Überexpression von SAF-A eine Umverteilung von aktivierten, nukleär lokalisierten Glucocorticoid-Rezeptoren in die nukleäre Matrix vermittelt, wodurch die Aktivität Glucocorticoid-induzierbarer Reporterplasmide stark verringert wird. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde für die Funktion von endogenem SAF-A gefolgert, dass das matrixassoziierte hnRN-

Protein als nukleärer Speicher für aktivierte Hormonrezeptoren fungiert (Eggert *et al.*, 2001). Interessanterweise kann jedoch für die transiente Überexpression von E1B-AP5 kein signifikanter Einfluss auf die hormoninduzierte Promotoraktivität festgestellt werden (5.1.2.1). Die in diesem Kontext unterschiedliche Funktion von E1B-AP5 im Vergleich zu SAF-A wird durch die Beobachtung unterstrichen, dass die nicht induzierte Aktivität des Glucocorticoid-regulierten Promotors durch die transiente Überexpression von E1B-AP5 sogar gesteigert wird, im Gegensatz zu SAF-A, welches eine Verringerung verursacht (5.1.2.1). Die Analyse verschiedener E1B-AP5-Mutanten zeigt, dass Deletionen der RGG- oder PP-Domäne keine signifikante Veränderung dieser Funktion verursachen. Die Deletion der gesamten carboxyterminalen Hälfte führt jedoch zur Aufhebung der E1B-AP5-vermittelten Aktivitätssteigerung des nicht induzierten Glucocorticoid-regulierten Promotors (5.1.2.2).

Eine Möglichkeit zur Erklärung dieser Ergebnisse ergibt sich aus der Vorstellung, dass E1B-AP5 eine direkte Wechselwirkung mit der Promotorregion des nicht induzierten, hormonregulierten Reporterplasmids eingeht und über einen noch nicht identifizierten Kofaktor die Transaktivierung vermittelt. Die Induktion mit Glucocorticoiden würde durch den sehr viel stärkeren Effekt die E1B-AP5-vermittelte Transaktivierung verschleiern. Für dieses Modell spricht die Beobachtung, dass Mitglieder der hnRNP-Familie direkt mit der Promotorregion Vitamin D-regulierter Gene interagieren können (Chen *et al.*, 2003).

Viel plausibler ist jedoch die Überlegung, dass das überexprimierte E1B-AP5 mit endogenem SAF-A um die Bindung von Glucocorticoid-Rezeptoren konkurriert und diese aus dem inaktivierenden, matrixassoziierten Komplex löst. Diese Interpretation der Ergebnisse setzt jedoch voraus, dass ein basaler Spiegel nukleärer Glucocorticoid-Rezeptoren im Komplex mit endogenem SAF-A in der nukleären Matrix lokalisiert ist. Tatsächlich deutet die beobachtete SAF-A-vermittelte Repression der Aktivität des nicht induzierten, Glucocorticoid-regulierten Promotors (5.1.2.1) darauf hin, dass experimentell bedingt eine schwache Hormoninduktion nicht zu verhindern war, da bei vollständiger Inhibition die Überexpression von SAF-A keinen Einfluss auf die Promotoraktivität ausübt (Eggert *et al.*, 1997; Eggert *et*

al., 2001). Darüber hinaus erfordert dieses Modell eine Interaktion von E1B-AP5 mit Glucocorticoid-Rezeptoren. Die Tatsache, dass die identifizierte Interaktionsdomäne von SAF-A (Eggert *et al.*, 1997) eine 83 %ige Homologie zum Bereich der Aminosäurereste 348 - 605 in der Primärstruktur von E1B-AP5 aufweist, scheint auf eine Wechselwirkung von E1B-AP5 mit Glucocorticoid-Rezeptoren hinzudeuten. Darüber hinaus ist das E1B-AP5-Protein in der Lage mit p300 zu interagieren (5.1.6), einem zellulären Kofaktor der Hormonrezeptor-vermittelten Transkriptionsregulation (Chakravarti *et al.*, 1996), wodurch eine indirekte Wechselwirkung denkbar ist. Die Frage, ob die Funktion von E1B-AP5, mit der SAF-A-vermittelten Hormonrezeptorbindung zu interferieren, eine Folge der transienten Überexpression ist oder im Kontext der endogenen Proteine eine Rolle spielt, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig beantwortet werden. Unabhängig davon führt die Deletion der gesamten carboxyterminalen Region von E1B-AP5 zu einer Aufhebung der Aktivitätssteigerung im Kontext des nicht induzierten Glucocorticoid-regulierten Promotors (5.1.2.2). Zusätzlich wird im Gegensatz zum Vollängenprotein durch die Deletionsmutante eine Repression der Promotoraktivität nach Induktion mit Glucocorticoiden verursacht (5.1.2.2). Diese Ergebnisse deuten auf die Beteiligung weiterer Faktoren hin, ungeachtet des postulierten Modells.

6.1.3 BRD7 ein zellulärer Interaktionspartner von E1B-AP5

Auf der Suche nach zellulären Interaktionspartnern, die im Zusammenhang mit den transkriptionsregulatorischen Aktivitäten von E1B-AP5 stehen, gelang im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Identifizierung von BRD7, ein bis dahin unbekanntes humanes, zelluläres Protein (5.1.3). Die In-vitro-Analyse der Wechselwirkung von verschiedenen E1B-AP5-Deletionsmutanten mit dem BRD7-Protein zeigt (5.1.3.3), dass ein zentraler Bereich von E1B-AP5 die Bindung an den zellulären Interaktionspartner vermittelt. Interessanterweise kann im BRD7-Polypeptid zusätzlich eine hochkonservierte *bromo*-Domäne identifiziert werden (Abb. 12; 5.1.3), welche neuesten Untersuchungen zur Folge die Wechselwirkung mit acetylierten Lysinresten unter anderem von Histonproteinen vermittelt (zur Übersicht: Zeng und

Zhou, 2002). Tatsächlich zeigen die In-vitro-Bindungstudien, dass BRD7 mit verschiedenen Histonproteinen spezifisch über die *bromo*-Domäne interagiert (5.1.4), welche für die Interaktion mit E1B-AP5 jedoch nicht notwendig ist (5.1.3.4). Zusätzlich lassen die Daten darauf schließen, dass E1B-AP5 über BRD7 einen trimeren Komplex mit Histonproteinen ausbildet (5.1.4.1). Dieses Ergebnis führte zu der Überlegung, dass BRD7 eine Verbindung der Funktionen von E1B-AP5 zur Chromatinstruktur schafft, da analoge Eigenschaften für das homologe, murine Protein postuliert werden (Cuppen *et al.*, 1999). Die Untersuchung verschiedener Deletionsmutanten der BRD7-Interaktionsdomäne im E1B-AP5-Protein ergab, dass im Vergleich zum Vollängenprotein die Repression der basalen Aktivität verschiedener Promotoren verstärkt wird (5.1.5). Hochinteressant sind die Ergebnisse zur Auswirkung der Deletionen der BRD7-Interaktionsdomäne im Kontext der Glucocorticoid-Rezeptor-regulierten Transkription (5.1.5). Es zeigt sich, dass die transiente Überexpression der Deletionsmutanten nicht nur eine Aufhebung der E1B-AP5-vermittelten Transaktivierung nicht induzierter, Glucocorticoid-regulierter Promotoren verursacht, sondern eine sehr starke Repression der Promotoren hervorruft, ungeachtet der Hormoninduktion endogener Glucocorticoid-Rezeptoren (5.1.5). Dieses Ergebnis bestätigt zum einen, dass sich die repressorische Funktion des Vollängenproteins auf die initialen Vorgänge im Präinitiationskomplex der RNA-Pol II beschränkt (6.1.1), da die spezifische Transkriptionsfaktor-vermittelte Aktivierung der mRNA-Synthese nicht beeinflusst wird. Zum anderen deuten diese Daten darauf hin, dass die untersuchten E1B-AP5-Deletionsmutanten einen dominant negativen Effekt auf die CDK7-vermittelte Phosphorylierung der CTD der RNA-Pol II (6.1.1) ausüben und dadurch eine effiziente Repression der Transkription verursachen. Für diese Überlegung sprechen vergleichbare Resultate, die kürzlich für das SCP1-Polypeptid, eine neuartige RNA-Pol II-CTD-Phosphatase, beschrieben wurden (Yeo *et al.*, 2003). Dieses Protein weist eine hohe Spezifität für Phospho-Serinreste an Position fünf in der CTD der RNA-Pol II auf und ist damit ein zellulärer TFIIH-Antagonist, welcher die Loslösung der RNA-Pol II aus dem Präinitiationskomplex reguliert. Analog zu den Auswirkungen der BRD7-Deletionsmutanten des E1B-AP5-Proteins zeigt die

transiente Überexpression des SCP1-Polypeptids unter anderem eine vergleichbar starke Repression der Glucocorticoid-Rezeptor-vermittelten Transkriptionsaktivierung. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass in beiden Fällen die repressorische Wirkung auf einer Verhinderung/Aufhebung der CDK7-vermittelten Phosphorylierung der CTD der RNA-Pol II beruht.

Insgesamt führen diese Ergebnisse zu der Schlussfolgerung, dass im Zuge der Promotoraktivierung durch genspezifische Transkriptionsfaktoren die E1B-AP5-verursachte Hemmung der CDK7-Kinase im Präinitiationskomplex (6.1.1) durch die BRD7-Wechselwirkung aufgehoben und dadurch die prozessive RNA-Synthese im Zuge der Phosphorylierung der RNA-Pol II eingeleitet wird. Vorläufige Ergebnisse scheinen dabei auf einen allgemeinen Regulationsprozess hinzudeuten (Daten nicht gezeigt) und die Wirkung von E1B-AP5 nicht auf die Glucocorticoid-vermittelte Transkriptionsregulation zu beschränken. Die Wechselwirkung von Histonproteinen mit der *bromo*-Domäne des BRD7-Polypeptids führt zusätzlich zur Überlegung, dass die Struktur des Chromatins eine Rolle für die Aufhebung der E1B-AP5-vermittelten Hemmung der RNA-Pol II spielt. Diese Modellvorstellung wird durch Beobachtungen von Staal und Mitarbeitern bestärkt, die humanes BRD7 parallel zur Charakterisierung in dieser Arbeit unter dem Synonym Celtix-1 in Verbindung mit dem IRF-2-Protein identifizierten (Staal *et al.*, 2000). Dabei wurde gezeigt, dass das BRD7-Protein sowohl mit acetylierten Histonproteinen als auch mit hyperphosphorylierter RNA-Pol II kolokalisiert und damit in Verbindung mit aktiven Prozessen der RNA-Synthese steht (Staal *et al.*, 2000).

6.2 Organisation des E1B-AP5-Genlokus

Da die Kontrolle der initialen Vorgänge der Transkription durch das E1B-AP5-Protein auf eine zentrale Rolle im zellulären RNA-Metabolismus schließen lässt (6.1.1), wurden Untersuchungen zur Regulation der E1B-AP5-Genexpression durchgeführt. Dabei wurde zunächst die Exon-Intron-Struktur und die genomische Organisation von E1B-AP5 bestimmt (5.2.1). Es zeigte sich überraschenderweise, dass

im Promotorbereich P1 der E1B-AP5-Transkriptionseinheit keine TATA-Box identifiziert werden kann (5.2.2), ein konserviertes Sequenzmotiv für das TATA-binding-Protein (Usheva *et al.*, 1992), welches als Bestandteil des generellen Transkriptionsfaktors TFIID an der Transkriptionsinitiation vieler proteinkodierender Gene beteiligt ist (Dynlacht *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 1992). Dies weist das E1B-AP5-Gen als Mitglied der Gruppe der Haushaltsgene aus, deren gemeinsames Merkmal das Fehlen einer TATA-Box ist (zur Übersicht: Smale, 1997) und unterstreicht die zentrale Funktion von E1B-AP5 als Kofaktor der mRNA-Synthese. Darüber hinaus wurde im Zuge der Transkript-Analysen (5.2.3; 5.2.4) die bis dahin unbekannte mRNA-Variante E1B-AP5-A identifiziert, welche im Unterschied zum bisher bekannten Transkript E1B-AP5 ein alternatives Exon 1A im 5' terminalen Teil enthält (5.2.4). Die Analyse der Promotorstruktur P1A, welche die Regulation Exon 1A-beinhalten der Transkripte vermittelt ergab, dass P1A analog zu P1 keine TATA-Box enthält (5.2.5) und deutet auf vergleichbare Regulationsmechanismen hin. Interessanterweise zeichnet sich die resultierende Proteinisoform E1B-AP5-A durch eine Verkürzung der aminoterminalen 100 Aminosäurereste aus (Abb. 31; 5.2.4), welche eine Deletion der SAP-Homologiedomäne des Volllängenproteins umfasst (Abb. 5; 2.3). Dieser Befund läßt auf unterschiedliche Funktionen der Proteinisoformen schließen und spiegelt Ergebnisse neuester Untersuchungen wieder, denen zur Folge 35 - 59 % humaner Gene für alternativ gespleißte mRNA-Spezies kodieren und damit die Diversität der Funktionen der abgeleiteten Proteine ungemein erhöhen (zur Übersicht: Maniatis und Tasic, 2002).

6.3 Unterschiedliche Funktionen der E1B-AP5-Isoformen

Die Beobachtung, dass die Proteinisoform E1B-AP5-A eine Deletion der aminoterminalen Region beinhaltet, führten zu der Überlegung, welche Funktionen dieser Proteinbereich des Volllängenproteins vermittelt. Es zeigte sich, dass die aminoterminal verkürzte Proteinisoform E1B-AP5-A nur eingeschränkt die basale Aktivität verschiedener Promotoren verringert (5.3.1). Dies bedeutet, dass für die

vollständige Repression der CDK7-Kinase durch E1B-AP5 dessen SAP-Domäne notwendig ist. Darüber hinaus ist E1B-AP5-A nicht mehr in der Lage, die Aktivität nicht induzierter Glucocorticoid-regulierter Promotoren zu erhöhen (5.3.1). Daraus kann gefolgert werden, dass je nach Modell (6.1.2), E1B-AP5-A entweder keine Wechselwirkung mehr mit der Promotorregion des Glucocorticoid-regulierten Reporterplasmids eingeht, oder aber nicht mehr mit endogenem SAF-A um die Bindung mit aktivierten Glucocorticoid-Rezeptoren konkurrieren kann. Damit ist die Beteiligung der Proteinisoform E1B-AP5-A an den initialen Vorgängen der mRNA-Synthese unwahrscheinlich. Zusätzliche Hinweise auf die unterschiedlichen Funktionen der E1B-AP5-Proteinisoformen ergeben sich aus der Analyse des Einflusses der transienten Überexpression auf den Transformationsprozess primärer Zellen (5.3.2). Es zeigt sich, dass die *ras*/E1A-verursachte Anzahl transformierter Zellkolonien (*Foci*) durch das Volllängenprotein stark reduziert wird. Die Deletion der BRD7-Interaktionsdomäne zeigt dabei keinen Einfluss auf diese Funktion von E1B-AP5. Im Gegensatz dazu wird die *Focus*-Anzahl durch das aminoterminal verkürzte E1B-AP5-A sehr viel weniger verringert (5.3.2). Damit scheint die Proteinisoform E1B-AP5-A auch bei der Inhibition der *ras*/E1A-vermittelten Transformation primärer Zellen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

6.3.1 Kontrolle der Zellzyklusprogression durch E1B-AP5

Die Analogie der Ergebnisse zur Regulation der Transkriptionsinitiation und zur Transformationsinhibition führt zu der Überlegung, dass ein einziger zugrunde liegender Mechanismus beide Funktionen des Volllängenproteins E1B-AP5 vermittelt. Für diese Modellvorstellung spricht die Tatsache, dass die CDK7-Untereinheit des generellen Transkriptionsfaktors TFIIF ein integraler Bestandteil des *cdk-activating kinase* (CAK)-Komplexes ist (Roy *et al.*, 1994; Serizawa *et al.*, 1995; zur Übersicht: Kaldis *et al.*, 2001). Darüber hinaus beruht die Aktivierung aller an der Zellzykluskontrolle beteiligter *cyclin dependent kinases* (CDK) unter anderem auf der CDK7-vermittelten Phosphorylierung spezifischer Threoninreste (zur Übersicht: Kaldis *et al.*, 2001). Damit bietet die E1B-AP5-vermittelte Inhibition der

Zellzyklusprogression durch die Hemmung der CDK7-Kinase-Aktivität eine plausible Erklärung für die Verringerung des Wachstums transformierter Zellen (5.3.2). Die Ergebnisse der Proliferationsstudien scheinen diese Überlegung zu bestätigen, da die Überexpression von E1B-AP5 auch mit dem Wachstum etablierter Zelllinien interferiert (5.3.3), nicht jedoch die Proteinisoform E1B-AP5-A. Die Beteiligung des p53-Proteins kann in diesem Zusammenhang ausgeschlossen werden, da die untersuchte Zelllinie durch eine genomische Deletion des p53-Genlokus charakterisiert ist (Mitsudomi *et al.*, 1992). Die Frage, ob die Kontrolle der Zellzyklusprogression durch E1B-AP5 eine grundlegende Funktion des Proteins ist oder durch die Überexpression verursacht wird, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig beantwortet werden. Die Daten zur Inhibition der E1A/E1B-vermittelten Transformation (5.3.3) deuten jedoch darauf hin, dass auch im Kontext der Zellzykluskontrolle, das E1B-AP5-Protein ein zelluläres Ziel des adenoviralen E1B-55 kDa-Onkoproteins darstellt. Für diese Überlegung spricht, dass die Überexpression des E1B-AP5-Polypeptids einen sehr viel geringeren Einfluss auf die Reduktion der *Focus*-Anzahl ausübt, im Vergleich zur *ras*/E1A-vermittelten Transformation. Dieser Effekt lässt auf eine teilweise Hemmung von überexprimierten E1B-AP5 durch das E1B-55 kDa-Protein schließen. Die für dieses Modell vorausgesetzte Interaktion des viralen Genprodukts mit dem zellulären Protein ergibt sich aus den ursprünglichen Experimenten unserer Arbeitsgruppe, die E1B-AP5 als zelluläres Zielprotein des E1B-55 kDa-Polypeptids identifizierten (Gabler *et al.*, 1998). Umgekehrt verursacht die Proteinisoform E1B-AP5-A dennoch eine zum Vollängenprotein vergleichbare Verringerung der *Focus*-Anzahl im E1A/E1B-vermittelten Transformationsprozess, obwohl diese den vorliegenden Daten zur Folge keinen direkten Einfluss auf die CDK7-Kinase-Aktivität ausübt. Dieses zunächst widersprüchliche Ergebnis kann dadurch erklärt werden, dass die überexprimierte Isoform E1B-AP5-A durch Konkurrenz endogenes E1B-AP5 aus dem Komplex mit dem E1B-55 kDa-Protein freisetzt.

Insgesamt führen diese Daten zu der Modellvorstellung, dass E1B-AP5 an der Kontrolle der Zellzyklusprogression beteiligt ist und durch das E1B-55 kDa-Protein moduliert wird. Diese Überlegung wird durch Ergebnisse von Goodrum und

Mitarbeiter bestärkt, die zeigen dass verschiedene adenovirale Mutanten von E1B-55 kDa in der lytischen Replikation schwere Defekte aufweisen (Goodrum und Ornelles, 1998). Die Infektion in der zellulären S-Phase führt jedoch zu einer Teilaufhebung des defekten Phänotyps, im Vergleich zu Infektionen in der G1-Phase der Zellen. Da diese Mutanten gleichzeitig Defekte im viralen RNA-Transport aufweisen wurde gefolgert, dass die Funktionen von einem oder mehreren Faktoren des zellulären RNA-Metabolismus und/oder der Zellzykluskontrolle während der adenoviralen Replikation moduliert werden (Goodrum und Ornelles, 1998). Obwohl die genauen Mechanismen der E1B-AP5-vermittelten Zellzykluskontrolle erst noch aufgeklärt werden müssen, weisen diese Daten auf eine mögliche Beteiligung des hnRN-Proteins an der Kontrolle des G1/S-Phasen Übergangs hin.

Insgesamt lassen die Ergebnisse dieser Arbeit erstmals darauf schließen, dass durch die Rekrutierung von E1B-AP5 durch das E1B-55 kDa-Protein beide Voraussetzungen, Aufhebung der Zellzykluskontrolle und Modulation des RNA-Metabolismus, für die effiziente lytische Replikation geschaffen werden. Basierend auf diesem Modell, sollte die weitere Aufklärung der molekularen Mechanismen zur E1B-AP5-vermittelten Zellzykluskontrolle dazu beitragen, ein genaueres Verständnis der Prozesse im lytischen Replikationszyklus von humanen Adenoviren zu gewinnen.

6.3.2 Beteiligung von E1B-AP5-A am nukleären mRNA-Export

Aufgrund der Beobachtung, dass die direkte Beteiligung der Proteinisoform E1B-AP5-A an den für das Vollängenprotein E1B-AP5 identifizierten Prozessen unwahrscheinlich ist, stellte sich die Frage, welche Rolle die verkürzte Proteinisoform im zellulären Kontext spielt. Die Analysen zur intranukleären Lokalisation der Proteinisoformen (5.4.3) zeigen, dass im Gegensatz zum Vollängenprotein, welches sowohl mit der nukleären Matrix als auch mit Chromatin assoziiert vorliegt (5.4.1; 5.4.2), E1B-AP5-A als löslicher Bestandteil im Zellkern lokalisiert ist. Diese Ergebnisse bestätigen zum einen, dass die SAP-Domäne im aminoterminalen Bereich des Vollängenproteins (Abb. 40; 5.4) funktionell die

Lokalisation von E1B-AP5 in die nukleäre Matrix vermittelt und für die Wechselwirkung mit Chromatin notwendig ist. Darüber hinaus deuten die Daten darauf hin, dass chromatinassoziiertes E1B-AP5 eine andere posttranslationale Modifizierung aufweist als das matrixassoziierte Polypeptid (5.4.1), was auf eine Regulation der intranukleären Lokalisation schließen lässt. Zum anderen führt die Beobachtung zur intranukleären Verteilung der Proteinisoform E1B-AP5-A zu der Schlussfolgerung, dass diese kein Bestandteil der nukleären Matrix ist und nicht im Komplex mit Chromatin im Zellkern vorliegt. Hinweise zur Funktion von E1B-AP5-A ergeben sich aus Untersuchungen von Bachi und Mitarbeitern zur Funktion des TAP-Proteins im zellulären mRNA-Export (Bachi *et al.*, 2000). TAP wurde ursprünglich als zellulärer Faktor für den nukleären Export der genomischen RNA des *simian retrovirus type D* identifiziert, welcher durch ein *constitutive transport element* (CTE) der RNA vermittelt wird (Braun *et al.*, 1999). Die detaillierten In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen zur Funktion von TAP ergaben, dass dieses Protein analog zum homologen Hefe-Polypeptid Mex67p (Segref *et al.*, 1997; Santos-Rosa *et al.*, 1998) mit Komponenten des Kernporenkomplexes in Wechselwirkung tritt (zur Übersicht: Doye und Hurt, 1997; Mattaj und Englmeier, 1998) und die Translokation von mRNA-Partikeln aus dem Zellkern in das Zytoplasma vermittelt (Bachi *et al.*, 2000). Im Gegensatz zur CTE-enthaltenden viralen RNA gehen zelluläre mRNA-Spezies nur eine sehr schwache direkte Interaktion mit dem TAP-Protein ein. Es zeigte sich, dass Adaptermoleküle die indirekte Wechselwirkung mit mRNA-Partikeln vermitteln. In diesem Zusammenhang wurde neben Transportin (Pollard *et al.*, 1996) und hGle2 (Kraemer und Blobel, 1997; Pritchard *et al.*, 1999) eine lösliche, nukleoplasmatische Form von E1B-AP5 identifiziert, dessen Wechselwirkungsdomäne mit TAP auf einen Bereich der Aminosäurereste 101 - 619 des Vollängenproteins kartiert wurde (Bachi *et al.*, 2000). Diese verblüffende Übereinstimmung mit dem aminoterminalen Bereich der Proteinisoform E1B-AP5-A zusammen mit deren nukleoplasmatischen Lokalisation führt zu der Schlussfolgerung, dass E1B-AP5-A hauptsächlich am TAP-vermittelten mRNA-Export beteiligt sein könnte.

6.4 Modellvorstellung zur Funktion der E1B-AP5-Proteinisoformen

Die strukturelle Organisation des Interphase-Zellkerns in funktionelle Domänen wird nach heutigem Verständnis durch das dreidimensionale Proteinnetzwerk der nukleären Matrix vermittelt. Die Analyse verschiedener matrixassoziierter Proteine zeigt, dass wichtige nukleäre Prozesse, wie zum Beispiel DNA-Replikation, Transkription, Prozessierung der Prä-mRNA und RNA-Transport in enger Verbindung mit dem nukleären Proteinnetzwerk stehen (zur Übersicht: Berezney *et al.*, 1995; Stein *et al.*, 1996). Die Mitglieder der hnRN-Proteinfamilie wurden dabei schon in den achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts als integraler Bestandteil der nukleären Matrix identifiziert (Fey *et al.*, 1986). Darüber hinaus zeigen neuere Untersuchungen, dass auch Transkriptions- und Spleißfaktoren als Komponenten im nukleären Proteingrundgerüst lokalisiert sind (zur Übersicht: Misteli, 2000). Nach heutigem Kenntnisstand sind dabei die verschiedenen Prozesse der eukaryontischen mRNA-Synthese zusätzlich über ein komplexes regulatorisches Netzwerk miteinander verbunden (zur Übersicht: Maniatis und Reed, 2002).

Vor diesem Hintergrund führen die Ergebnisse dieser Arbeit erstmals zur nachfolgenden Modellvorstellung, welche die verschiedenen Funktionen von E1B-AP5/E1B-AP5-A in das komplexe Zusammenspiel der am RNA-Metabolismus beteiligten Faktoren einbindet (Abb. 47). Obwohl zum jetzigen Zeitpunkt noch keine genaue Aussage über die tatsächliche Reihenfolge der ablaufenden Prozesse gemacht werden kann, scheint die Wechselwirkung mit S/MAR-Regionen chromosomaler DNA (6.3) ein frühes Ereignis der E1B-AP5-vermittelten Funktionen zu sein. Diese DNA-Elemente sind neben der Beteiligung an der räumlichen Organisation der nukleären DNA zusätzlich über verschiedene Mechanismen an der Genregulation beteiligt (Cockerill und Garrard, 1986; Gasser und Laemmli, 1986; Stief *et al.*, 1989; Jenuwein *et al.*, 1997). Die beobachtete Interaktion von E1B-AP5 mit dem zellulären Protein p300 (5.1.6) lässt vermuten, dass analog zu SAF-A durch die p300-vermittelte Acetylierung von Histonproteinen übergeordnete Chromatinstrukturen für die Transkription vorbereitet werden (Martens *et al.*, 2002). Diese p300-vermittelte Acetylierung von Histonen wird allgemein als Schlüsselmechanismus für die

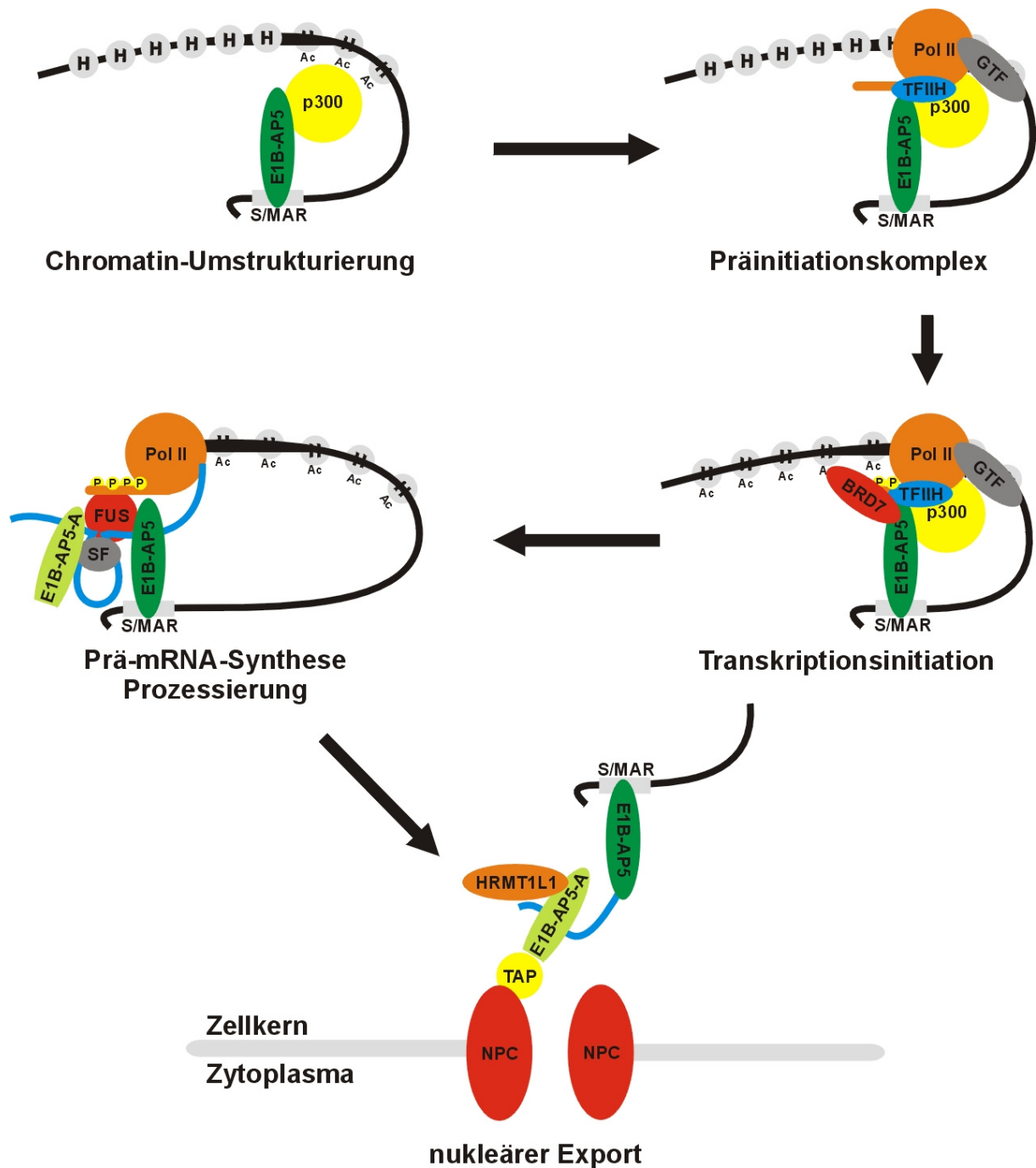


Abb. 47 Modell zur Funktion der E1B-AP5-Proteinisoformen im zellulären RNA-Metabolismus

Dargestellt sind die verschiedenen Prozesse der eukaryontischen mRNA-Synthese im Kontext der Funktionen der E1B-AP5-Proteinisoformen. Dabei wurde die Darstellung der einzelnen Schritte stark vereinfacht, was sowohl die beteiligten Faktoren, die räumliche Anordnung, die stöchiometrischen Verhältnisse als auch die zeitliche Abfolge betrifft. Im zellulären Kontext ist deshalb eine viel stärkere Überlappung der verschiedenen Ereignisse zu erwarten. Die DNA wurde schwarz, RNA blau dargestellt. Weitere Details sind dem Text zu entnehmen. H: Histonproteine; Ac: Acetylreste; P: Phosphatreste; Pol II: RNA-Pol II; SF: Spleißfaktoren; NPC: *nuclear pore complex* (Kernporenkomplex).

Regulation der Transkription angenommen und ermöglicht die Wechselwirkung weiterer Faktoren mit der in übergeordneten Chromatinstrukturen sonst

unzugänglichen DNA (zur Übersicht: Brownell und Allis, 1996; Grunstein, 1997). Darüber hinaus interagiert das p300-Protein unter anderem mit einer Reihe von generellen Transkriptionsfaktoren und scheint damit an der Bildung des Präinitiationskomplexes beteiligt zu sein (zur Übersicht: Goodman und Smolik, 2000). Die E1B-AP5-vermittelte Repression von TFIID verhindert dabei eine vorzeitige Phosphorylierung der RNA-Pol II (6.1.1).

Die Promotoraktivierung durch spezifische Transkriptionsfaktoren führt dann zur Aufhebung der E1B-AP5-vermittelten Hemmung der CDK7-Kinase-Aktivität von TFIID wodurch die nachfolgenden Schritte der prozessiven Prä-mRNA-Synthese eingeleitet werden. An dieser Regulation ist das BRD7-Protein maßgeblich beteiligt, das vermutlich mit acetylierten Histonproteinen interagiert (6.1.3), welche ein charakteristisches Merkmal aktiv transkribierter Gene sind (Ura *et al.*, 1997; Nightingale *et al.*, 1998). Dies führt über einen noch aufzuklärenden Mechanismus zur posttranslationalen Modifikation von E1B-AP5 (6.3.2). Höchstwahrscheinlich werden dabei weitere Faktoren in die Regulation eingebunden, da im BRD7-Polypeptid keine katalytischen Domänen identifiziert werden können (5.1.3).

Im Zuge der prozessiven Prä-mRNA-Synthese scheint das E1B-AP5-Protein die naszierende RNA im Komplex der nukleären Matrix mit dem Chromatin zu verbinden (6.3.2). Interessanterweise ist das E1B-AP5-Protein zusätzlich in der Lage mit dem TLS-Protein (Synonym FUS) zu interagieren (Justl, 1998). Das TLS-Protein, welches ursprünglich als onkogenes Fusionsprotein mit dem Transkriptionsfaktor CHOP identifiziert wurde (Crozat *et al.*, 1993; Rabbitts *et al.*, 1993), ist neueren Untersuchungen zur Folge an matrixassoziierten Spleißreaktionen beteiligt (Zhang und Wu, 1998; Meissner *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000; Meissner *et al.*, 2003). Damit ist das E1B-AP5-Protein vermutlich auch an der Koordination der kotranskriptionell ablaufenden Prä-mRNA-Prozessierung beteiligt.

Schließlich deuten die Daten zur Funktion der Proteinisoform E1B-AP5-A darauf hin, dass durch dessen Rekrutierung der Export der reifen mRNA über den TAP-abhängigen Weg vermittelt wird (6.3.2). In diesem Zusammenhang könnte die E1B-AP5-Methylierung durch HRMT1L1 (Kzhyshkowska *et al.*, 2001) regulatorisch die TAP-Wechselwirkung und damit den Export beeinflussen. Ein vergleichbarer

Mechanismus wird für den Export von mRNA in *Saccharomyces cerevisiae* postuliert, wobei durch die Methylierung von hnRN-Proteinen die Translokation der mRNA aus dem Zellkern reguliert wird (Shen *et al.*, 1998; Green *et al.*, 2002).

Diese Verknüpfung der Prozesse der eukaryontischen mRNA-Synthese durch das E1B-AP5-Protein ist damit ein weiteres Beispiele dafür, wie durch ein funktionelles und regulatorisches Netzwerk die Effizienz der verschiedenen Schritte ungemein erhöht wird (zur Übersicht: Maniatis und Reed, 2002). Da fast alle der beschriebenen Funktionen des zellulären RNA-Metabolismus während der lytischen Replikation humaner Adenoviren beeinflusst werden (zur Übersicht: Dobner und Kzhyshkowska, 2001), bietet die funktionelle Modulation und/oder Inaktivierung einzelner Funktionen von E1B-AP5/E1B-AP5-A eine einfache Erklärung für diese Beobachtungen. Tatsächlich weist die Umstrukturierung im Verlauf des Replikationszyklus (5.4.4) darauf hin, dass das E1B-AP5-Protein ein zentrales Ziel der viralen Prozesse ist.

Basierend auf dieser Modellvorstellung sollte die weitere Aufklärung der Zusammenhänge der E1B-AP5/E1B-AP5-A-vermittelten Funktionen dazu beitragen, das allgemeine Verständnis zur eukaryontischen mRNA-Synthese zu vertiefen und tiefere Einblicke in die Adenovirus-vermittelten Prozesse zu gewinnen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Alarcon-Vargas, D. und Ronai, Z.** (2002). p53-Mdm2- the affair that never ends. *Carcinogenesis* **23**(4), 541-547.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J. D.** (1997). Molekularbiologie der Zelle. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo.
- Ankerst, J., Jonsson, N., Kjellen, L., Norrby, E. und Sjogren, H. O.** (1974). Induction of mammary fibroadenomas in rats by adenovirus type 9. *Int. J. Cancer* **13**(3), 286-290
- Ankerst, J. und Jonsson, N.** (1989). Adenovirus type 9-induced tumorigenesis in the rat mammary gland related to sex hormonal state. *J Natl Cancer Inst* **81**(4), 294-298
- Avvakumov, N., Wheeler, R., D'Halluin, J. C. und Mymryk, J. S.** (2002). Comparative sequence analysis of the largest E1A proteins of human and simian adenoviruses. *J Virol* **76**(16), 7968-7975
- Babiss, L. E. und Ginsberg, H. S.** (1984). Adenovirus type 5 early region 1b gene product is required for efficient shutoff of host protein synthesis. *J Virol* **50**(1), 202-212
- Bachi, A., Braun, I. C., Rodrigues, J. P., Pante, N., Ribbeck, K., von Kobbe, C., Kutay, U., Wilm, M., Gorlich, D., Carmo-Fonseca, M. und Izaurralde, E.** (2000). The C-terminal domain of TAP interacts with the nuclear pore complex and promotes export of specific CTE-bearing RNA substrates. *Rna* **6**(1), 136-158
- Bagchi, S., Raychaudhuri, P. und Nevins, J. R.** (1990). Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation. *Cell* **62**(4), 659-669.
- Barrack, E. R.** (1987). Localization of steroid hormone receptors in the nuclear matrix. Ellis Horwood Ltd., Chichester, England.
- Beato, M., Herrlich, P. und Schutz, G.** (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* **83**(6), 851-857.
- Beck, K. F., Stathopoulos, I., Berninger, M. G. und Schweizer, M.** (1993). Overcoming GC compression in nucleotide sequencing. *Biotechniques* **14**(3), 375.
- Beltz, G. A. und Flint, S. J.** (1979). Inhibition of HeLa cell protein synthesis during adenovirus infection. Restriction of cellular messenger RNA sequences to the nucleus. *J Mol Biol* **131**(2), 353-373

- Benko, M., Elo, P., Ursu, K., Ahne, W., LaPatra, S. E., Thomson, D. und Harrach, B.** (2002). First molecular evidence for the existence of distinct fish and snake adenoviruses. *J Virol* **76**(19), 10056-10059.
- Berezney, R. und Coffey, D. S.** (1974). Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem Biophys Res Commun* **60**(4), 1410-1417.
- Berezney, R., Mortillaro, M. J., Ma, H., Wei, X. und Samarabandu, J.** (1995). The nuclear matrix: a structural milieu for genomic function. *Int Rev Cytol* 1-65
- Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L. und Finberg, R. W.** (1997). Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**, 1320-1323
- Berk, A. J.** (1986). Adenovirus promoters and E1A transactivation. *Annu Rev Genet* **20**, 45-79
- Berkner, K. L. und Sharp, P. A.** (1985). Effect of the tripartite leader on synthesis of a non-viral protein in an adenovirus 5 recombinant. *Nucleic Acids Res* **13**(3), 841-857
- Bernards, R. a. v. d. E., A. J.** (1984). Adenovirus: Transformation and Oncogenicity. *Biochim. Biophys. Acta* **783**, 187-204
- Braun, I. C., Rohrbach, E., Schmitt, C. und Izaurrealde, E.** (1999). TAP binds to the constitutive transport element (CTE) through a novel RNA-binding motif that is sufficient to promote CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Embo J* **18**(7), 1953-1965.
- Brownell, J. E. und Allis, C. D.** (1996). Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev* **6**(2), 176-184.
- Buermeyer, A. B., Thompson, N. E., Strasheim, L. A., Burgess, R. R. und Farnham, P. J.** (1992). The HIP1 initiator element plays a role in determining the in vitro requirement of the dihydrofolate reductase gene promoter for the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **12**(5), 2250-2259.
- Burgert, H. G. und Blusch, J. H.** (2000). Immunomodulatory functions encoded by the E3 transcription unit of adenoviruses. *Virus Genes* **21**(1-2), 13-25
- Byrd, P., Brown, K. W. und Gallimore, P. H.** (1982). Malignant transformation of human embryo retinoblasts by cloned adenovirus 12 DNA. *Nature* **298**(5869), 669-671
- Carlson, M.** (1997). Genetics of transcriptional regulation in yeast: connections to the RNA polymerase II CTD. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 1-23
- Chakravarti, D., LaMorte, V. J., Nelson, M. C., Nakajima, T., Schulman, I. G., Juguilon, H., Montminy, M. und Evans, R. M.** (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* **383**(6595), 99-103.

- Chauvin, C., Suh, M., Remy, C. und Benabid, A. L.** (1990). Failure to detect viral genomic sequences of three viruses (herpes simplex, simian virus 40 and adenovirus) in human and rat brain tumors. *Ital J Neurol Sci* **11**(4), 347-357
- Chen, H., Hewison, M., Hu, B. und Adams, J. S.** (2003). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) binding to hormone response elements: A cause of vitamin D resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(10), 6109-6114
- Chi, T. und Carey, M.** (1996). Assembly of the isomerized TFIIA--TFIID--TATA ternary complex is necessary and sufficient for gene activation. *Genes Dev* **10**(20), 2540-2550.
- Chinnadurai, G.** (1998). Control of apoptosis by human adenovirus genes. *Semin. Virol.* **8**, 399-408
- Cockerill, P. N. und Garrard, W. T.** (1986). Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell* **44**(2), 273-282.
- Corden, J. L.** (1990). Tails of RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* **15**(10), 383-387.
- Crozat, A., Aman, P., Mandahl, N. und Ron, D.** (1993). Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma. *Nature* **363**(6430), 640-644.
- Cuppen, E., van Ham, M., Pepers, B., Wieringa, B. und Hendriks, W.** (1999). Identification and molecular characterization of BP75, a novel bromodomain-containing protein. *FEBS Lett* **459**(3), 291-298.
- Dahmus, M. E.** (1996). Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* **271**(32), 19009-19012.
- Dobner, T. und Kzhyskowska, J.** (2001). Nuclear export of adenovirus RNA. *Curr Top Microbiol Immunol* **259**,25-54
- Dolph, P. J., Racaniello, V., Villamarin, A., Palladino, F. und Schneider, R. J.** (1988). The adenovirus tripartite leader may eliminate the requirement for cap-binding protein complex during translation initiation. *J Virol* **62**(6), 2059-2066
- Dolph, P. J., Huang, J. T. und Schneider, R. J.** (1990). Translation by the adenovirus tripartite leader: elements which determine independence from cap-binding protein complex [published erratum appears in J Virol 1990 Aug;64(8):4042]. *J Virol* **64**(6), 2669-2677
- Dörfler, W.** (1996). A new concept in adenoviral oncogenesis: integration of foreign DNA and its consequences. *Biochim. Biophys. Acta* **1288**,F79-F99
- Doye, V. und Hurt, E.** (1997). From nucleoporins to nuclear pore complexes. *Curr Opin Cell Biol* **9**(3), 401-411.

- Dreyfuss, G., Matunis, M. J., Pinol-Roma, S. und Burd, C. G.** (1993). hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem* **62**, 289-321
- Dulbecco, R. und Freeman, G.** (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology* **8**, 396-397
- Dynlacht, B. D., Hoey, T. und Tjian, R.** (1991). Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell* **66**(3), 563-76.
- Dyson, M. H., Rose, S. und Mahadevan, L. C.** (2001). Acetyllysine-binding and function of bromodomain-containing proteins in chromatin. *Front Biosci* **6**, D853-865.
- Eggert, H., Schulz, M., Fackelmayer, F. O., Renkawitz, R. und Eggert, M.** (2001). Effects of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (hnRNP U/SAF- A) on glucocorticoid-dependent transcription in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol* **78**(1), 59-65.
- Eggert, M., Mows, C. C., Tripier, D., Arnold, R., Michel, J., Nickel, J., Schmidt, S., Beato, M. und Renkawitz, R.** (1995). A fraction enriched in a novel glucocorticoid receptor-interacting protein stimulates receptor-dependent transcription in vitro. *J Biol Chem* **270**(51), 30755-30759.
- Eggert, M., Michel, J., Schneider, S., Bornfleth, H., Baniahmad, A., Fackelmayer, F. O., Schmidt, S. und Renkawitz, R.** (1997). The glucocorticoid receptor is associated with the RNA-binding nuclear matrix protein hnRNP U. *J Biol Chem* **272**(45), 28471-28478.
- Enders, J. F., Bell, J. A. und Dingle, J. H.** (1956). "Adenoviruses": group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science* **124**, 119-120
- Endter, C., Kzhyshkowska, J., Stauber, R. und Dobner, T.** (2001). SUMO-1 modification required for transformation by adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20), 11312-11317.
- Fallaux, F. J., Kranenburg, O., Cramer, S. J., Houweling, A., Van Ormondt, H., Hoeben, R. C. und Van Der Eb, A. J.** (1996). Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* **7**(2), 215-222
- Fallaux, F. J., Bout, A., van der Velde, I., van den Wollenberg, D. J., Hehir, K. M., Keegan, J., Auger, C., Cramer, S. J., van Ormondt, H., van der Eb, A. J., Valerio, D. und Hoeben, R. C.** (1998). New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther* **9**(13), 1909-1917
- Fey, E. G., Wan, K. M. und Penman, S.** (1984). Epithelial cytoskeletal framework and nuclear matrix-intermediate filament scaffold: three-dimensional organization and protein composition. *J Cell Biol* **98**(6), 1973-1984.
- Fey, E. G., Krochmalnic, G. und Penman, S.** (1986). The nonchromatin substructures of the nucleus: the ribonucleoprotein (RNP)-containing and RNP-depleted matrices analyzed by sequential fractionation and resinless section electron microscopy. *J Cell Biol* **102**(5), 1654-1665.

- Flint, J. und Shenk, T.** (1989). Adenovirus E1A protein paradigm viral transactivator. *Annu Rev Genet* **23**, 141-161
- Freedman, D. A. und Levine, A. J.** (1998). Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Mol Cell Biol* **18**(12), 7288-7293.
- Gabler, S., Schütt, H., Groitl, P., Wolf, H., Shenk, T. und Dobner, T.** (1998). E1B 55-kilodalton-associated protein: a cellular protein with RNA-binding activity implicated in nucleocytoplasmic transport of adenovirus and cellular mRNAs. *J Virol* **72**(10), 7960-7971
- Gallimore, P. H., Byrd, P. J., Whittaker, J. L. und Grand, R. J.** (1985). Properties of rat cells transformed by DNA plasmids containing adenovirus type 12 E1 DNA or specific fragments of the E1 region: comparison of transforming frequencies. *Cancer Res* **45**(6), 2670-2680
- Gallimore, P. H., Grand, R. J. und Byrd, P. J.** (1986). Transformation of human embryo retinoblasts with simian virus 40, adenovirus and ras oncogenes. *Anticancer Res* **6**(3 Pt B), 499-508
- Gary, J. D. und Clarke, S.** (1998). RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **61**, 65-131
- Gasser, S. M. und Laemmli, U. K.** (1986). Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. *Cell* **46**(4), 521-530.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H. und Parks, W. P.** (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* **51**(5), 1417-1423.
- Goodman, R. H. und Smolik, S.** (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* **14**(13), 1553-1577.
- Goodrum, F. D. und Ornelles, D. A.** (1998). p53 status does not determine outcome of E1B 55-kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *J Virol* **72**(12), 9479-9490.
- Graham, F. L. und van der Eb, A. J.** (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**(2), 456-467.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. und Nairn, R.** (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**(1), 59-74
- Graham, F. L.** (1984). Transformation by and oncogenicity of human adenoviruses. The adenoviruses. H. S. Ginsberg. New York, Plenum Press, 339-398.
- Green, D. M., Marfatia, K. A., Crafton, E. B., Zhang, X., Cheng, X. und Corbett, A. H.** (2002). Nab2p is required for poly(A) RNA export in *Saccharomyces cerevisiae* and is regulated by arginine methylation via Hmt1p. *J Biol Chem* **277**(10), 7752-7760.

- Grunstein, M.** (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**(6649), 349-352.
- Hall, T. A.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**, 95-98
- Harada, J. N. und Berk, A. J.** (1999). p53-Independent and -dependent requirements for E1B-55K in adenovirus type 5 replication. *J Virol* **73**(7), 5333-5344
- Hengartner, C. J., Myer, V. E., Liao, S. M., Wilson, C. J., Koh, S. S. und Young, R. A.** (1998). Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin- dependent kinases. *Mol Cell* **2**(1), 43-53.
- Hilleman, M. R. und Werner, J. H.** (1954). Recovery of new agents from patients with acute respiratory illness. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **85**, 183-188
- Hirose, Y. und Manley, J. L.** (2000). RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev* **14**(12), 1415-1429.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. und Pease, L. R.** (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**(1), 51-59.
- Horridge, J. J. und Leppard, K. N.** (1998). RNA-binding activity of the E1B 55-kilodalton protein from human adenovirus type 5. *J Virol* **72**(11), 9374-9379
- Horwitz, M. S.** (1996). Adenoviruses. Virology. B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley. New York, Lippincott-Raven. **2**, 2149-2171.
- Horwitz, M. S.** (2001). Adenovirus immunoregulatory genes and their cellular targets. *Virology* **279**(1), 1-8.
- Houweling, A., van den Elsen, P. J. und van der Eb, A. J.** (1980). Partial transformation of primary rat cells by the leftmost 4.5% fragment of adenovirus 5 DNA. *Virology* **105**(2), 537-550
- Huebner, R. J., Rowe, W. P., Ward, T. G., Parrot, R. H. und Bell, J. A.** (1954). Adenoidal-pharyngeal conjunctival agents. *N. Engl. J. Med.* **251**, 1077-1086
- Hutton, F. G., Turnell, A. S., Gallimore, P. H. und Grand, R. J.** (2000). Consequences of disruption of the interaction between p53 and the larger adenovirus early region 1B protein in adenovirus E1 transformed human cells. *Oncogene* **19**(3), 452-462
- Javier, R., Raska, K., Jr., Macdonald, G. J. und Shenk, T.** (1991). Human adenovirus type 9-induced rat mammary tumors. *J Virol* **65**(6), 3192-3202
- Jeanmougin, F., Wurtz, J. M., Le Douarin, B., Chambon, P. und Losson, R.** (1997). The bromodomain revisited. *Trends Biochem Sci* **22**(5), 151-153.

- Jenuwein, T., Forrester, W. C., Fernandez-Herrero, L. A., Laible, G., Dull, M. und Grosschedl, R.** (1997). Extension of chromatin accessibility by nuclear matrix attachment regions. *Nature* **385**(6613), 269-272.
- Jones, N. und Shenk, T.** (1979). Isolation of adenovirus type 5 host range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cells. *Cell* **17**(3), 683-689
- Jonsson, N. und Ankerst, J.** (1977). Studies on adenovirus type 9-induced mammary fibroadenomas in rats and their malignant transformation. *Cancer* **39**(6), 2513-2519
- Justl, M.** (1998). Das adenovirale E1B-55 kDa-Onkoprotein interagiert mit dem RNA-bindenden Protein TLS/fus. Dissertation, Universität Regensburg.
- Kaelin, W. G., Jr., Pallas, D. C., DeCaprio, J. A., Kaye, F. J. und Livingston, D. M.** (1991). Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product. *Cell* **64**(3), 521-532.
- Kaldis, P., Tsakraklides, V., Ross, K. E., Winter, E. und Cheng, A.** (2001). Cdk-activating Kinase (CAK): Activating Phosphorylation of Cyclin-dependent Kinases in Budding Yeast. Landes Bioscience, Georgetown.
- Kao, C. C., Yew, P. R. und Berk, A. J.** (1990). Domains required for in vitro association between the cellular p53 and the adenovirus 2 E1B 55K proteins. *Virology* **179**(2), 806-814
- Kawaguchi, Y., Bruni, R. und Roizman, B.** (1997). Interaction of herpes simplex virus 1 alpha regulatory protein ICP0 with elongation factor 1delta: ICP0 affects translational machinery. *J Virol* **71**(2), 1019-1024.
- Kay, B. K., Williamson, M. P. und Sudol, M.** (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *Faseb J* **14**(2), 231-241.
- Kim, M. K. und Nikodem, V. M.** (1999). hnRNP U inhibits carboxy-terminal domain phosphorylation by TFIIF and represses RNA polymerase II elongation. *Mol Cell Biol* **19**(10), 6833-6844.
- Kipp, M., Gohring, F., Ostendorp, T., van Drunen, C. M., van Driel, R., Przybylski, M. und Fackelmayer, F. O.** (2000). SAF-Box, a conserved protein domain that specifically recognizes scaffold attachment region DNA. *Mol Cell Biol* **20**(20), 7480-7489.
- Knippers, R.** (1997). Molekulare Genetik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Koritschoner, N. P., Bocco, J. L., Panzetta-Dutari, G. M., Dumur, C. I., Flury, A. und Patrito, L. C.** (1997). A novel human zinc finger protein that interacts with the core promoter element of a TATA box-less gene. *J Biol Chem* **272**(14), 9573-9580.
- Kraemer, D. und Blobel, G.** (1997). mRNA binding protein mrnp 41 localizes to both nucleus and cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(17), 9119-9124.

- Kratzer, F., Rosorius, O., Heger, P., Hirschmann, N., Dobner, T., Hauber, J. und Stauber, R. H.** (2000). The adenovirus type 5 E1B-55K oncoprotein is a highly active shuttle protein and shuttling is independent of E4orf6, p53 and Mdm2. *Oncogene* **19**(7), 850-857
- Krecic, A. M. und Swanson, M. S.** (1999). hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol* **11**(3), 363-371.
- Krumm, A., Hickey, L. B. und Groudine, M.** (1995). Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II defines a general rate-limiting step after transcription initiation. *Genes Dev* **9**(5), 559-572.
- Kzhyshkowska, J., Schutt, H., Liss, M., Kremmer, E., Stauber, R., Wolf, H. und Dobner, T.** (2001). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1B-AP5 is methylated in its Arg-Gly-Gly (RGG) box and interacts with human arginine methyltransferase HRMT1L1. *Biochem J* **358**(Pt 2), 305-314.
- Leppard, K. N.** (1993). Selective effects on adenovirus late gene expression of deleting the E1b 55K protein. *J Gen Virol* **74**(Pt 4), 575-582
- Liang, S., Hitomi, M. und Tartakoff, A. M.** (1995). Adenoviral E1B-55kDa protein inhibits yeast mRNA export and perturbs nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(16), 7372-7375
- Logan, J. und Shenk, T.** (1984). Adenovirus tripartite leader sequence enhances translation of mRNAs late after infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(12), 3655-3659
- Lu, H., Zawel, L., Fisher, L., Egly, J. M. und Reinberg, D.** (1992). Human general transcription factor IIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nature* **358**(6388), 641-645.
- Ma, H., Siegel, A. J. und Berezney, R.** (1999). Association of chromosome territories with the nuclear matrix. Disruption of human chromosome territories correlates with the release of a subset of nuclear matrix proteins. *J Cell Biol* **146**(3), 531-542.
- Mackey, J. K., Rigden, P. M. und Green, M.** (1976). Do highly oncogenic group A human adenoviruses cause human cancer? Analysis of human tumors for adenovirus 12 transforming DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **73**(12), 4657-4661
- Mackey, J. K., Green, M., Wold, W. S. M. und Ridgen, P.** (1979). Analysis of human cancer DNA for DNA sequences of human adenovirus type 4. *J. Natl. Cancer Inst.* **62**, 23-26
- Majello, B. und Napolitano, G.** (2001). Control of RNA polymerase II activity by dedicated CTD kinases and phosphatases. *Front Biosci* **6**, D1358-1368.
- Maldonado, E. und Reinberg, D.** (1995). News on initiation and elongation of transcription by RNA polymerase II. *Curr Opin Cell Biol* **7**(3), 352-361.
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. und et al.** (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**(6), 835-839.

- Maniatis, T. und Reed, R.** (2002). An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* **416**(6880), 499-506.
- Maniatis, T. und Tasic, B.** (2002). Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* **418**(6894), 236-243.
- Mantovani, R.** (1999). The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* **239**(1), 15-27.
- Marcellus, R. C., Teodoro, J. G., Wu, T., Brough, D. E., Ketner, G., Shore, G. C. und Branton, P. E.** (1996). Adenovirus type 5 early region 4 is responsible for E1A-induced p53-independent apoptosis. *J. Virol.* **70**, 6207-6215
- Marshall, N. F. und Price, D. H.** (1992). Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes. *Mol Cell Biol* **12**(5), 2078-2090.
- Martens, J. H., Verlaan, M., Kalkhoven, E., Dorsman, J. C. und Zantema, A.** (2002). Scaffold/matrix attachment region elements interact with a p300- scaffold attachment factor A complex and are bound by acetylated nucleosomes. *Mol Cell Biol* **22**(8), 2598-2606.
- Martin, M. E. und Berk, A. J.** (1998). Adenovirus E1B 55K represses p53 activation in vitro. *J. Virol.* **72**(4), 3146-3154
- Martin, M. E. und Berk, A. J.** (1999). Corepressor required for adenovirus E1B 55,000-molecular-weight protein repression of basal transcription. *Mol. Cell. Biol.* **19**(5), 3403-3414
- Mattaj, I. W. und Englmeier, L.** (1998). Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* **67**, 265-306
- Mattern, K. A., van der Kraan, I., Schul, W., de Jong, L. und van Driel, R.** (1999). Spatial organization of four hnRNP proteins in relation to sites of transcription, to nuclear speckles, and to each other in interphase nuclei and nuclear matrices of HeLa cells. *Exp Cell Res* **246**(2), 461-470.
- McLorie, W., McGlade, C. J., Takayesu, D. und Branton, P. E.** (1991). Individual adenovirus E1B proteins induce transformation independently but by additive pathways. *J. Gen. Virol.* **72**, 1467-1471
- Meissner, M., Dechat, T., Gerner, C., Grimm, R., Foisner, R. und Saueremann, G.** (2000). Differential nuclear localization and nuclear matrix association of the splicing factors PSF and PTB. *J Cell Biochem* **76**(4), 559-566.
- Meissner, M., Lopato, S., Gotzmann, J., Saueremann, G. und Barta, A.** (2003). Proto-oncoprotein TLS/FUS is associated to the nuclear matrix and complexed with splicing factors PTB, SRm160, and SR proteins. *Exp Cell Res* **283**(2), 184-195.
- Misteli, T.** (2000). Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *J Cell Sci* **113**(Pt 11), 1841-1849.

- Mitsudomi, T., Steinberg, S. M., Nau, M. M., Carbone, D., D'Amico, D., Bodner, S., Oie, H. K., Linnoila, R. I., Mulshine, J. L., Minna, J. D. und et al.** (1992). p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene* **7**(1), 171-180.
- Modrow, S. und Falke, D.** (1997). *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Moore, M., Horikoshi, N. und Shenk, T.** (1996). Oncogenic potential of the adenovirus E4orf6 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11295-11301
- Nevels, M., Rubenwolf, S., Spruss, T., Wolf, H. und Dobner, T.** (1997). The adenovirus E4orf6 protein can promote E1A/E1B-induced focus formation by interfering with p53 tumor suppressor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1206-1211
- Nevels, M., Spruss, T., Wolf, H. und Dobner, T.** (1999). The adenovirus E4orf6 protein contributes to malignant transformation by antagonizing E1A-induced accumulation of the tumor suppressor protein p53. *Oncogene* **18**, 9-17
- Nevins, J. R. und Vogt, P. K.** (1996). Cell transformation by viruses. *Virology*. B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley. New York, Lippincott-Raven. **1**, 301-343.
- Nickerson, J. A., Blencowe, B. J. und Penman, S.** (1995). The architectural organization of nuclear metabolism. *Int Rev Cytol* 67-123
- Nickerson, J. A.** (2001). Experimental observations of a nuclear matrix. *J Cell Sci* **114**(Pt 3), 463-474.
- Nightingale, K. P., Wellinger, R. E., Sogo, J. M. und Becker, P. B.** (1998). Histone acetylation facilitates RNA polymerase II transcription of the *Drosophila* hsp26 gene in chromatin. *Embo J* **17**(10), 2865-2876.
- Oswald, F., Dobner, T. und Lipp, M.** (1996). The E2F transcription factor activates a replication-dependent human H2A gene in early S phase of the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1889-1895
- Parks, C. L., Banerjee, S. und Spector, D. J.** (1988). Organization of the transcriptional control region of the E1b gene of adenovirus type 5. *J Virol* **62**(1), 54-67
- Pfitzner, E., Jahne, R., Wissler, M., Stoecklin, E. und Groner, B.** (1998). p300/CREB-binding protein enhances the prolactin-mediated transcriptional induction through direct interaction with the transactivation domain of Stat5, but does not participate in the Stat5-mediated suppression of the glucocorticoid response. *Mol Endocrinol* **12**(10), 1582-93 Issn: 0888-8809
- Pilder, S., Moore, M., Logan, J. und Shenk, T.** (1986). The adenovirus E1B-55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs. *Mol Cell Biol* **6**(2), 470-476

- Pollard, V. W., Michael, W. M., Nakielny, S., Siomi, M. C., Wang, F. und Dreyfuss, G.** (1996). A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell* **86**(6), 985-994.
- Pritchard, C. E., Formerod, M., Kasper, L. H. und van Deursen, J. M.** (1999). RAE1 is a shuttling mRNA export factor that binds to a GLEBS-like NUP98 motif at the nuclear pore complex through multiple domains. *J Cell Biol* **145**(2), 237-254.
- Prives, C. und Hall, P. A.** (1999). The p53 pathway. *J Pathol* **187**(1), 112-126.
- Ptashne, M. und Gann, A.** (1997). Transcriptional activation by recruitment. *Nature* **386**(6625), 569-577.
- Querido, E., Marcellus, R., Lai, A., Rachel, C., Teodoro, J. G., Ketner, G. und Branton, P. E.** (1997). Regulation of p53 levels by the E1B 55-kilodalton protein and E4orf6 in adenovirus-infected cells. *J. Virol.* **71**, 3788-3798
- Querido, E., Blanchette, P., Yan, Q., Kamura, T., Morrison, M., Boivin, D., Kaelin, W. G., Conaway, R. C., Conaway, J. W. und Branton, P. E.** (2001). Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes Dev* **15**(23), 3104-3117.
- Rabbitts, T. H., Forster, A., Larson, R. und Nathan, P.** (1993). Fusion of the dominant negative transcription regulator CHOP with a novel gene FUS by translocation t(12;16) in malignant liposarcoma. *Nat Genet* **4**(2), 175-180.
- Reich, N. C., Sarnow, P., Duprey, E. und Levine, A. J.** (1983). Monoclonal antibodies which recognize native and denatured forms of the adenovirus DNA-binding protein. *Virology* **128**, 480-484
- Roberts, S. G. und Green, M. R.** (1994). Activator-induced conformational change in general transcription factor TFIIB. *Nature* **371**(6499), 717-720.
- Romig, H., Fackelmayer, F. O., Renz, A., Ramsperger, U. und Richter, A.** (1992). Characterization of SAF-A, a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear matrix/scaffold attachment DNA elements. *Embo J* **11**(9), 3431-3440.
- Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrot, R. H. und Ward, T. G.** (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **84**, 570-573
- Roy, R., Adamczewski, J. P., Seroz, T., Vermeulen, W., Tassan, J. P., Schaeffer, L., Nigg, E. A., Hoeijmakers, J. H. und Egly, J. M.** (1994). The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIH transcription- DNA repair factor. *Cell* **79**(6), 1093-1101.
- Rubewolf, S.** (1999). Destabilisierung des Tumorsuppressorproteins p53 durch adenovirale Proteine, Dissertation, Universität Regensburg.
- Russell, W. C.** (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* **81** (Pt 11), 2573-2604.

- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**(4839), 487-491.
- Sandaltzopoulos, R. und Becker, P. B.** (1998). Heat shock factor increases the reinitiation rate from potentiated chromatin templates. *Mol Cell Biol* **18**(1), 361-367.
- Santos-Rosa, H., Moreno, H., Simos, G., Segref, A., Fahrenkrog, B., Pante, N. und Hurt, E.** (1998). Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores. *Mol Cell Biol* **18**(11), 6826-6838.
- Schiedner, G., Hertel, S. und Kochanek, S.** (2000). Efficient transformation of primary human amniocytes by E1 functions of ad5: generation of new cell lines for adenoviral vector production [In Process Citation]. *Hum. Gene Ther.* **11**(15), 2105-2116
- Schütt, H.** (2000). Molekularbiologische Charakterisierung des hnRNP-Proteins E1B-AP5. Dissertation, Universität Regensburg.
- Segref, A., Sharma, K., Doye, V., Hellwig, A., Huber, J., Luhrmann, R. und Hurt, E.** (1997). Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)+ RNA and nuclear pores. *Embo J* **16**(11), 3256-3271.
- Serizawa, H., Makela, T. P., Conaway, J. W., Conaway, R. C., Weinberg, R. A. und Young, R. A.** (1995). Association of Cdk-activating kinase subunits with transcription factor TFIIF. *Nature* **374**(6519), 280-282.
- Sharma, R. C. und Schimke, R. T.** (1996). Preparation of electrocompetent E. coli using salt-free growth medium. *Biotechniques* **20**(1), 42-44.
- Shen, E. C., Henry, M. F., Weiss, V. H., Valentini, S. R., Silver, P. A. und Lee, M. S.** (1998). Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes Dev* **12**(5), 679-691.
- Shenk, T.** (1996). Adenoviridae: the viruses and their replication. Virology. B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley. New York, Lippincott-Raven. **2**, 2111-2148.
- Smale, S. T.** (1997). Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochim Biophys Acta* **1351**(1-2), 73-88.
- Smith, D. B. und Johnson, K. S.** (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**(1), 31-40.
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. und Brennan, M.** (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **51**(5), 1409-1416.
- Spector, D. S., Goldman, R. D. und Leinwand, L. A.** (1998). The nuclear matrix: preparation for microscopy and biochemical analysis. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Staal, A., Enserink, J. M., Stein, J. L., Stein, G. S. und van Wijnen, A. J.** (2000). Molecular characterization of celtix-1, a bromodomain protein interacting with the transcription factor interferon regulatory factor 2. *J Cell Physiol* **185**(2), 269-279.
- Stein, G. S., Stein, J. L., Lian, J. B., van Wijnen, A. J. und Montecino, M.** (1996). Functional interrelationships between nuclear structure and transcriptional control: contributions to regulation of cell cycle- and tissue-specific gene expression. *J Cell Biochem* **62**(2), 198-209.
- Stief, A., Winter, D. M., Stratling, W. H. und Sippel, A. E.** (1989). A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position- independent gene activity. *Nature* **341**(6240), 343-345.
- Struhl, K.** (1998). Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* **12**(5), 599-606.
- Täuber, B. und Dobner, T.** (2001a). Adenovirus early E4 genes in viral oncogenesis. *Oncogene* **20**(54), 7847-7854.
- Täuber, B. und Dobner, T.** (2001b). Molecular regulation and biological function of adenovirus early genes: the E4 ORFs. *Gene* **278**(1-2), 1-23.
- Teodoro, J. G., Shore, G. C. und Branton, P. E.** (1995). Adenovirus E1A proteins induce apoptosis by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene* **11**(3), 467-474
- Tooze, J.** (1981). DNA tumor viruses. Cold Spring Harbor. New York, Cold Spring Harbor Laboratory. **2nd ed.**, 943-1054.
- Trentin, J. J., Yabe, Y. und Taylor, G.** (1962). The quest for human cancer viruses. *Science* **137**, 835-849
- Ura, K., Kurumizaka, H., Dimitrov, S., Almouzni, G. und Wolffe, A. P.** (1997). Histone acetylation: influence on transcription, nucleosome mobility and positioning, and linker histone-dependent transcriptional repression. *Embo J* **16**(8), 2096-2107.
- Usheva, A., Maldonado, E., Goldring, A., Lu, H., Houbavi, C., Reinberg, D. und Aloni, Y.** (1992). Specific interaction between the nonphosphorylated form of RNA polymerase II and the TATA-binding protein. *Cell* **69**(5), 871-881.
- van den Heuvel, S. J., The, S. I., Klein, B., Jochemsen, A. G., Zantema, A. und van der Eb, A. J.** (1992). p53 shares an antigenic determinant with proteins of 92 and 150 kilodaltons that may be involved in senescence of human cells. *J Virol* **66**(1), 591-595.
- White, E.** (1995). Regulation of p53-dependent apoptosis by E1A and E1B. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199**(Pt 3), 34-58
- White, E.** (1998). Regulation of apoptosis by adenovirus E1A and E1B oncoproteins. *Semin. Virol.* **8**, 505-513

- Whittaker, J. L., Byrd, P. J., Grand, R. J. und Gallimore, P. H.** (1984). Isolation and characterization of four adenovirus type 12-transformed human embryo kidney cell lines. *Mol Cell Biol* **4**(1), 110-116
- Wold, W. S., Mackey, J. K., Rigden, P. und Green, M.** (1979). Analysis of human cancer DNA's for DNA sequence of human adenovirus serotypes 3, 7, 11, 14, 16, and 21 in group B1. *Cancer Res* **39**(9), 3479-3484
- Xie, Z. und Price, D.** (1997). Drosophila factor 2, an RNA polymerase II transcript release factor, has DNA-dependent ATPase activity. *J Biol Chem* **272**(50), 31902-31907.
- Yang, L., Embree, L. J. und Hickstein, D. D.** (2000). TLS-ERG leukemia fusion protein inhibits RNA splicing mediated by serine-arginine proteins. *Mol Cell Biol* **20**(10), 3345-3354.
- Yang, U. C., Huang, W. und Flint, S. J.** (1996). mRNA export correlates with activation of transcription in human subgroup C adenovirus-infected cells. *J Virol* **70**(6), 4071-4080
- Yee, C., Krishnan-Hewlett, I., Baker, C. C., Schlegel, R. und Howley, P. M.** (1985). Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol* **119**(3), 361-366.
- Yeo, M., Lin, P. S., Dahmus, M. E. und Gill, G. N.** (2003). A novel RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase that preferentially dephosphorylates serine 5. *J Biol Chem* **28** [epub ahead of print]
- Yew, P. R., Kao, C. C. und Berk, A. J.** (1990). Dissection of functional domains in the adenovirus 2 early 1B 55K polypeptide by suppressor-linker insertional mutagenesis. *Virology* **179**(2), 795-805
- Yew, P. R. und Berk, A. J.** (1992). Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature* **357**(6373), 82-85
- Yew, P. R., Liu, X. und Berk, A. J.** (1994). Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. *Genes Dev.* **8**, 190-202
- Zantema, A., Fransen, J. A., Davis, O. A., Ramaekers, F. C., Vooijs, G. P., DeLeys, B. und van der Eb, A. J.** (1985). Localization of the E1B proteins of adenovirus 5 in transformed cells, as revealed by interaction with monoclonal antibodies. *Virology* **142**(1), 44-58
- Zeng, L. und Zhou, M. M.** (2002). Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett* **513**(1), 124-128.
- Zhang, W. J. und Wu, J. Y.** (1998). Sip1, a novel RS domain-containing protein essential for pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol* **18**(2), 676-684.
- Zhou, Q., Lieberman, P. M., Boyer, T. G. und Berk, A. J.** (1992). Holo-TFIID supports transcriptional stimulation by diverse activators and from a TATA-less promoter. *Genes Dev* **6**(10), 1964-1974.

VERÖFFENTLICHUNGEN

Posterpräsentationen auf Fachtagungen

Liss, M., Kremmer, E., Rusch, A., Kzhyshkowska, J., Wolf, H. und Dobner, T.: Evidenz für die Beteiligung der Protein-Arginin-Methylierung bei der EBV-vermittelten Immortalisierung primärer B-Lymphozyten. *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Wien, 26.-29. April 2000*

Barral, P., Rusch, A., Dobner, T., Byrd, P., Turnell, A., Gallimore, P. und Grand, R.: The regulation of expression and cellular binding partners of E1B associated protein 5 (E1B-AP5). *Molecular Biology of DNA Tumor Viruses Conference, Madison/USA, 9.-14. Juli 2002*

Rusch, A., Kzhyshkowska, J., und Dobner, T.: Analysis of E1B-AP5 associated cellular proteins. *Molecular Biology of DNA Tumor Viruses Conference, Madison/USA, 9.-14. Juli 2002*

Vorträge auf Fachtagungen

Kzhyshkowska, J., Rusch, A., Taeuber, B., Wolf, H. und Dobner, T.: E1B-55 kDa associated protein E1B-AP5 is a regulator of Transcription. *ICRF/UCSF DNA Tumour Virus Meeting, Cambridge/UK, 24.-29. Juli 2001*

Publikationen in Fachzeitschriften

Kzhyshkowska, J., Rusch, A., Wolf, H. und Dobner, T. (2003). Regulation of transcription by the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1B-AP5 is mediated by complex formation with the novel bromodomain-containing protein BRD7. *Biochem. J.* **371**, 385-393.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Mai 1999 und Mai 2003 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Hans Wolf danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit an seinem hervorragend ausgestatteten Institut.

Herrn Prof. Dr. Peter Hegemann danke ich für die bereitwillige Betreuung dieser Arbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Regensburg.

Besonders möchte ich mich bei Herrn PD. Dr. Thomas Dobner für seine ständige Bereitschaft über die eine oder andere Hürde hinweg zu helfen bedanken. Seine unermüdliche Motivation und die Unterstützung eigene Ideen zu diskutieren haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Allen meinen Arbeitskollegen danke ich für die durchwegs angenehme, freundschaftliche Atmosphäre, die auch weit über den normalen Laboralltag hinaus ging. Insbesondere möchte ich mich bei Barbara Härtl, Tanja Lukas, Kathrin Kindsmüller, Timo „Wookie“ Sieber, Birgitt Täuber, Thomas „Ich seh‘ des anders...“ Zeller und nicht zu vergessen Holger „Master of the Sequences“ Melzl bedanken.

Schließlich richtet sich mein größter Dank an meine Familie sowie an Birgitt, ohne deren tatkräftige Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

