

Untersuchung des funktionellen Potenzials der Adenovirus Typ 5 E1BN-Proteine



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

vorgelegt von
Timo Sieber
aus Hamburg
Mai 2008

Die vorliegende Arbeit wurde selbstständig
und ohne unzulässige Hilfe angefertigt.

Timo Sieber

Promotionsgesuch eingereicht am: 19.05.2008

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer und Prof. Dr. Thomas Dobner

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Rosemarie Baumann (Vorsitzender)
Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer (1. Prüfer, Erstgutachten)
Prof. Dr. Thomas Dobner (2. Prüfer, Zweitgutachten)
Prof. Dr. Herbert Tschochner (3. Prüfer)



*Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems,
das gelöst werden will.*

Galileo Galilei, Italienischer Physiker und Astronom

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGEN	V
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 ADENOVIREN	3
2.1.1 Klassifizierung	3
2.1.2 Klinik der humanen Adenoviren	4
2.1.3 Struktur und Genomorganisation	4
2.1.4 Lytischer Replikationszyklus	6
2.1.5 Persistente / latente Infektion	8
2.2 ONKOGENES POTENZIAL HUMANER ADENOVIREN	9
2.2.1 Modelle der viralen Onkogenese	11
2.2.1.1 <i>Klassisches Modell der viralen Onkogenese</i>	11
2.2.1.2 <i>„Hit & Run“-Modell der viralen Onkogenese</i>	12
2.2.2 Transformation durch humane Adenoviren	13
2.2.2.1 <i>Allgemein</i>	13
2.2.2.2 <i>Adenovirus Typ 5</i>	14
2.3 E1B-PROTEINE IN PRODUKTIVER INFEKTION UND TRANSFORMATION	14
2.3.1 E1B-Transkriptionseinheit von Adenovirus Typ 5	14
2.3.2 Ad5 E1B-19K und E1B-55K	16
2.3.3 Ad5 E1B-156R, E1B-93R und E1B-84R: E1BN-Proteine	19
2.4 AUFGABENSTELLUNG	21
3 MATERIAL	22
3.1 ZELLEN	22
3.1.1 Bakterienstämme	22
3.1.2 Säugerzellen	22
3.2 NUKLEINSÄUREN	23
3.2.1 Oligonukleotide	23
3.2.2 Vektoren	25
3.2.3 Rekombinante Plasmide	25
3.2.4 Bacmide	26
3.3 ADENOVIREN	27
3.4 ANTIKÖRPER	28
3.4.1 Primärantikörper	28
3.4.2 Sekundärantikörper	29
3.5 MOLEKULARBIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE MATERIALIEN	30
3.5.1 Größen- und Molekulargewichtsstandards	30
3.5.2 Kommerzielle Systeme	30
3.5.3 Enzyme	30

3.5.4	Chemikalien und Reagenzien	31
3.6	LABORMATERIALIEN	31
3.6.1	Laborgeräte	31
3.6.2	Verbrauchsmaterialien	32
3.7	TIERE	32
3.8	COMPUTERPROGRAMME UND DATENBANKEN	32
4	METHODEN	33
4.1	ARBEITEN MIT <i>E. COLI</i>	33
4.1.1	Kultivierung und Lagerung	33
4.1.2	Transformation von <i>E. coli</i>	34
4.1.3	Identifizierung rekombinanter Klone	35
4.2	DNA-TECHNIKEN	35
4.2.1	Isolierung von DNA	35
4.2.1.1	<i>Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli</i>	35
4.2.1.2	<i>Präparation genomischer DNA aus Säugerzellen</i>	36
4.2.1.3	<i>Präparation adenoviraler DNA aus Virus</i>	37
4.2.2	Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen	38
4.2.3	DNA-Restriktionsspaltung	38
4.2.4	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	39
4.2.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	40
4.2.6	Ligation von DNA-Fragmenten	40
4.2.7	DNA-Sequenzierung	41
4.2.8	Polymerase-Kettenreaktion	41
4.2.9	Gerichtete Mutagenese	42
4.3	RNA-TECHNIKEN	42
4.3.1	Isolierung zytoplasmatischer RNA aus Säugerzellen	42
4.3.2	Reverse Transkription	42
4.3.3	Isolierung und Klonierung der E1BN-cDNAs	43
4.4	ZELLKULTUR-TECHNIKEN	43
4.4.1	Kultivierung und Lagerung	43
4.4.2	Bestimmung der Zellzahl	45
4.4.3	Transfektion von Säugerzellen	45
4.4.3.1	<i>Kalziumphosphat-Methode</i>	45
4.4.3.2	<i>Liposomen-Methode</i>	46
4.4.4	Bestimmung der Zellmorphologie	47
4.4.5	Metaphasenchomosomen-Präparation	47
4.5	ADENOVIRUS-TECHNIKEN	48
4.5.1	Gewinnung rekombinanter Adenoviren	48
4.5.1.1	<i>Gewinnung E1-mutierter Bacmide</i>	48
4.5.1.2	<i>Rekonstitution von Adenoviren</i>	50
4.5.2	Herstellung und Lagerung hochtitriger Virusstocks	50
4.5.3	Bestimmung von Virustitern	51
4.5.4	Infektion mit Adenoviren	52
4.5.5	Ermittlung der Anzahl infektiöser Nachkommenviren	53

4.6	ZELLTRANSFORMATION DURCH ADENOVIRUS TYP 5-DNA	53
4.6.1	Gewinnung und Kultivierung primärer Rattennierenzellen	53
4.6.2	Transformation primärer Zellen	54
4.6.3	Etablierung transformierter Zelllinien	55
4.7	PROTEIN-TECHNIKEN	55
4.7.1	Zellernte	55
4.7.2	Zellaufschluß	56
4.7.2.1	<i>Gewinnung von Gesamtzellextrakten</i>	56
4.7.2.2	<i>Zellaufschluß für Immunpräzipitation mit BD-Natio</i>	56
4.7.2.3	<i>Gewinnung zytoplasmatischer Proteine</i>	57
4.7.3	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration	57
4.7.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	58
4.7.5	Immunpräzipitation	59
4.7.6	<i>Western Blot-Analyse</i>	61
4.7.7	Immunfluoreszenz-Analysen	63
4.8	TRANSKRIPTIONS-REPORTER-VERSUCH	64
5	ERGEBNISSE	66
5.1	HERSTELLUNG E1B-DEFIZIENTER VIREN	66
5.1.1	Design E1B-defizienter Viren	66
5.1.2	Verifizierung der E1B-defizienten Viren	70
5.2	CHARAKTERISIERUNG DER E1B-DEFIZIENTEN VIREN	75
5.2.1	Produktion infektiöser Nachkommenviren	75
5.2.2	Synthese später Strukturproteine	76
5.2.3	E1B-Proteine im Infektionsverlauf	78
5.2.3.1	<i>Gleichgewichtsmengen der E1B-Proteine</i>	78
5.2.3.2	<i>Lokalisation von E1B-55K und p53 in infizierten Zellen</i>	81
5.2.4	Gleichgewichtsmengen viraler und zellulärer E1B-55K-Interaktionspartner	84
5.2.4.1	<i>Gleichgewichtsmengen von E4orf6</i>	84
5.2.4.2	<i>Gleichgewichtsmengen von p53</i>	85
5.2.4.3	<i>Gleichgewichtsmengen von Mre11 und Rad50</i>	86
5.3	EXPRESSION DER E1BN-PROTEINE AUßERHALB DES VIRALEN KONTEXTS	88
5.4	IDENTIFIZIERUNG DER FUNKTIONEN VON E1B-156R	90
5.4.1	E1B-156R besitzt transformationsförderndes Potenzial	91
5.4.2	Charakterisierung E1A/E1B-156R-transformierter Zellen	92
5.4.3	Hinweise auf „ <i>Hit & Run</i> “-Transformation durch E1A und E1B-156R	93
5.4.4	E1B-156R interagiert mit p53	96
5.4.5	E1B-156R kann die p53-vermittelte Transaktivierung nicht reprimieren	100
5.4.6	E1B-156R besitzt eine funktionale Transkriptionsrepressionsdomäne	102
5.4.7	E1B-156R interagiert mit E1B-55K & besitzt Oligomerisierungspotenzial	103
5.4.8	E1B-156R hemmt E1B-55K-vermittelte Transkriptionsrepression	105
5.4.9	E1B-156R interagiert mit E4orf6, fördert aber nicht den p53-Abbau	108
5.5	HINWEISE AUF ALTERNATIVE TRANSFORMATIONSMECHANISMEN	110
5.5.1	E1B-156R interagiert nicht mit Mre11	110
5.5.2	E1B-156R interagiert mit dem Apoptoseregulator Daxx	112

6	DISKUSSION	114
6.1	HINWEISE AUF FUNKTIONEN DER E1BN-PROTEINE IN DER INFEKTION	114
6.1.1	Regulation des alternativen Spleißens an SA2	114
6.1.2	E1B-84R, E1B-93R und E1B-156R sind funktionale Proteine	116
6.1.3	Die Inaktivierung von E1B-93R oder E1B-84R beeinflusst die Infektion	118
6.1.4	Hinweise auf funktionelle Wechselwirkungen der E1BN-Proteine	119
6.2	FUNKTIONSTUDIEN AN E1B-156R	121
6.2.1	E1B-156R als transformationsförderndes Protein	121
6.2.2	E1B-156R und „Hit & Run“-Transformation	122
6.2.3	E1B-156R kann p53 nicht wie E1B-55K inhibieren	124
6.2.4	E1B-156R als potenzieller Transkriptionsrepressor	126
6.2.5	E1B-156R als Regulator der Transkriptionsrepression durch E1B-55K	127
6.2.6	Denkbare Konsequenzen der E1B-156R/E4orf6-Interaktion	128
6.2.7	E4orf6- und p53-Interaktionsbereiche in E1B-156R und E1B-55K	129
6.2.8	Hinweise auf alternative Mechanismen zur Transformationsförderung	130
6.3	AUSBLICK	132
7	LITERATURVERZEICHNIS	134
8	VERÖFFENTLICHUNGEN	147
9	DANKSAGUNG	148

Abkürzungen

Ad2, Ad5,...	Adenovirus Typ 2, 5,...
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bid.	bidestilliert
Bp	Basenpaare
BRK-Zellen	Nierenzellen 3-5 Tage alter Sprague-Dawley-Ratten (<i>baby rat kidney cells</i>)
cDNA	DNA-Kopie einer RNA (<i>copy DNA</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E1, 2, 3, 4	frühe Region 1, 2, 3, 4 (<i>early region 1, 2, 3, 4</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
Gal4-BD	DNA-Bindedomäne des <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> Transkriptionsfaktors Gal4
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IgG	Immunglobulin der G-Klasse
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
L1, 2, 3, 4, 5	späte Region 1, 2, 3, 4, 5 (<i>late region 1, 2, 3, 4, 5</i>)
<i>moi</i>	Anzahl infektiöser Partikel pro Zelle (<i>multiplicity of infection</i>)
MLP	Promotor der MLTU (<i>major late promoter</i>)
MLTU	Späte Transkriptionseinheit (<i>major late transcription unit</i>)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
OD	Optische Dichte
<i>orf</i>	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
p. i.	Nach der Infektion (<i>post infection</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Protease-Inhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Aktivitätseinheit von Enzymen (<i>unit</i>)
UpM	Umdrehungen pro Minute
(v/v)	Teilvolumen pro Gesamtvolumen (<i>volume per volume</i>)
Vol.	Volumeneinheit
(w/v)	Gewicht pro Gesamtvolumen (<i>weight per volume</i>)
wt	Wildtyp

1 ZUSAMMENFASSUNG

Humane Adenoviren dienen seit langem als erfolgreiches Modellsystem zur Aufklärung von Mechanismen der zellulären Transformation und der Zellzykluskontrolle. Von besonderer Bedeutung sind hierbei die Genprodukte der E1B-Transkriptionseinheit. Die hier kodierten Proteine E1B-19K und E1B-55K werden intensiv studiert und tragen über verschiedene Mechanismen zur adenoviralen Replikation sowie zur Virus-vermittelten Onkogenese bei. Trotz dieser detaillierten Kenntnisse scheint das aktuelle Bild der E1B-Funktionen unvollständig zu sein, da durch alternative Spleißprozesse noch drei weitere, E1B-55K-verwandte Proteine - E1B-156R, E1B-93R und E1B-84R - gebildet werden. Diesen als E1BN-Proteine bezeichneten Genprodukten, konnte bisher noch keinerlei Funktionen zugeordnet werden, obwohl ihre Verwandtschaft mit E1B-55K eine Bedeutung für die virale Replikation und Transformation vermuten lässt.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob die E1BN-Proteine funktional sind und welche Aufgaben sie erfüllen. Neben ihren individuellen Aktivitäten wurde auch ihr Einfluss auf die Funktionen von E1B-55K bestimmt. Hierzu wurden Adenovirusmutanten generiert, mit denen erfolgreich gezeigt werden konnte, dass E1B-93R und E1B-84R Einfluss auf den Verlauf der Infektion nehmen. So scheint die Inaktivierung von E1B-93R mit Defekten in der Strukturproteinsynthese sowie in der Produktion infektiöser Nachkommenviren verbunden zu sein. Beide Prozesse werden bekanntermaßen durch Funktionen von E1B-55K gefördert. Ferner wurde festgestellt, dass E1B-93R und E1B-84R die Akkumulation des E1B-55K-Interaktionspartners E4orf6 gegensätzlich beeinflussen. Während eine Mutation von E1B-84R eine schnellere und stärkere Akkumulation des adenoviralen E4orf6-Proteins in der infizierten Zelle zur Folge hat, wirkt sich der Verlust von E1B-93R hierauf negativ aus. Daneben wurden Hinweise dafür gefunden, dass E1B-84R die subzelluläre Lokalisation von E1B-55K modulieren kann. Diese Daten zeigen somit, dass E1B-93R und E1B-84R funktional sind und weisen darauf hin, dass die Proteine E1B-55K unterschiedlich beeinflussen können.

Zur Aufklärung der Funktionen von E1B-156R wurden umfassende *in vitro*-Studien durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das Protein über eine aktive Transkriptionsrepressionsdomäne verfügt und mit E4orf6 und p53 wechselwirkt. Auch wurden Hinweise dafür gefunden, dass E1B-156R, ebenso wie E1B-55K, als Homodimer vorliegen kann. Da beide E1B-Proteine miteinander interagieren, könnte E1B-156R die Funktionen von E1B-55K durch Ausbildung von Heterodimeren beeinflussen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass E1B-156R die reprimierende Wirkung von E1B-55K auf p53 teilweise aufheben kann.

Durch Transformationsexperimente konnte außerdem nachgewiesen werden, dass E1B-156R transformationsförderndes Potenzial besitzt. Die Untersuchung der hierbei zugrunde liegenden Aktivitäten ergab, dass E1B-156R keinen der bisher für E1B-55K beschriebenen Mechanismen zur Transformationsförderung nutzt. Auch wurden Hinweise dafür gefunden, dass E1B-156R durch Induktion oder Verstärkung genomischer Instabilität eine zelluläre Transformation nach dem „Hit & Run“-Modell fördern kann.

Diese Beobachtungen zeigen somit, dass die transformationsfördernden Wirkungen der adenoviralen E1B-Proteine wahrscheinlich umfassender sind als bisher vermutet. Einen ersten Anhaltspunkt für die Natur des potenziellen neuen Transformationsmechanismus liefert die Beobachtung, dass E1B-156R mit dem zellulären Apoptoseregulator Daxx interagiert. Diese Interaktion könnte zu einer Verschiebung der zellulären DNA-Schadensantwort von Apoptoseinduktion zu Zellzyklusarrest führen. Da die adenoviralen E1A-Proteine jedoch die Induktion von Zellzyklusarrest im Transformationsprozess verhindern, könnte E1B-156R so das Überleben, die Proliferation und letztlich die Entartung genomisch instabiler Zellen ermöglichen.

Im Ganzen zeigt diese Arbeit erstmals, dass die E1B-55K-Isoformen E1B-156R, E1B-93R und E1B-84R funktionale Proteine sind. Dies legt den Grundstein für zukünftige Untersuchungen, die zu einem besseren Verständnis der E1B-Funktionen und der Vorgänge bei der adenoviralen Infektion führen sollen. Darüber hinaus könnte die Beobachtung, dass E1B-156R – vielleicht durch seine Interaktion mit Daxx – die zelluläre Transformation fördert, zur Aufklärung neuer Mechanismen der viralen und allgemeinen Onkogenese beitragen.

2 EINLEITUNG

2.1 Adenoviren

2.1.1 Klassifizierung

Adenoviren wurden 1953 erstmals aus adenoidem Gewebe und dem Rachensekret respiratorisch erkrankter Personen isoliert (Hilleman und Werner, 1954; Rowe *et al.*, 1953).

Heute umfasst die Familie der *Adenoviridae* mehr als 100 serologisch unterscheidbare Virustypen, die in vier Gattungen eingeteilt werden. Während die Aviadenoviren nur Vögel, und die Mastadenoviren ausschließlich Säuger infizieren, zeichnen sich die Atadenoviren und die Siadenoviren durch breitere Wirtsspektren aus. Darüber hinaus wurde mit den Ichtadenoviren der Fische die Einführung einer fünften Gattung vorgeschlagen (Benko *et al.*, 2002).

Die humanen Adenoviren zählen zu den Mastadenoviren und umfassen derzeit 52 Virustypen (Ad1 - Ad52). Diese werden - basierend auf verschiedenen Kriterien wie Sequenzhomologie, Hämagglutination, usw. - in sechs Subgruppen A-F eingeteilt (Berk, 2007). Der 2007 neu beschriebene Virustyp 52 konnte keiner der bereits existierenden Subgruppen zugeordnet werden. Es wurde stattdessen vorgeschlagen, Ad52 als ersten Vertreter einer neuen Subgruppe G zu klassifizieren (Jones *et al.*, 2007). In Abb. 2.1 ist ein Ausschnitt aus der Klassifizierung der Adenoviren dargestellt.

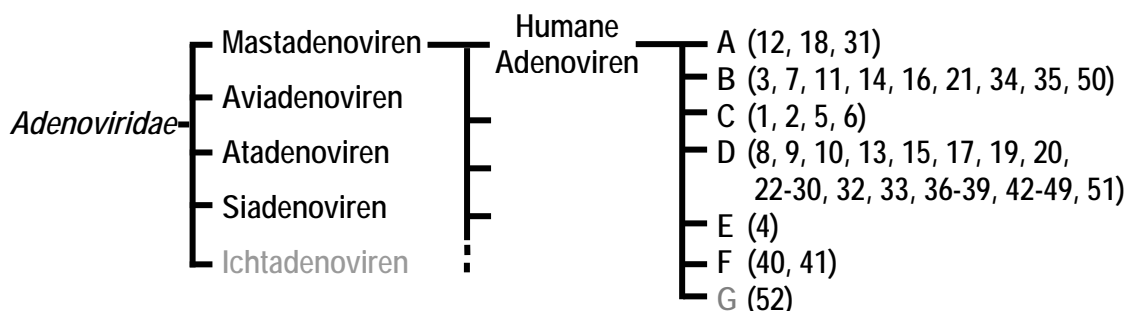


Abb. 2.1: Ausschnitt aus der Klassifizierung der Adenoviren. Die *Adenoviridae* sind in vier Gattungen unterteilt. Eine fünfte Gruppe, die Ichtadenoviren, wurde vorgeschlagen (grau). Die humanen Adenoviren gehören zu den Säuger-infizierenden Mastadenoviren und sind in die Subgruppen A-F unterteilt. Die Einführung einer neuen Subgruppe G für den Virustyp 52 wurde vorgeschlagen (grau).

2.1.2 Klinik der humanen Adenoviren

Adenoviren sind in der Lage eine Vielzahl sich teilender und differenzierter Zellen zu infizieren. Ihre bevorzugten Zielzellen sind jedoch postmitotisch ruhende Epithelzellen des Hals-, Nasen-, Rachenraumes, der Lunge sowie des Verdauungstraktes. In Zellkultur infizieren sie zahlreiche Tumorzelllinien und primäre Zelltypen (Berk, 2007).

Humane Adenoviren sind weltweit mit hoher Prävalenz verbreitet und können im Menschen Infektionen mit einer Vielzahl klinischer Symptome hervorrufen. Die ausgelösten Erkrankungen sind in der Regel harmlos, aber es können auch schwerwiegende Krankheitsbilder auftreten (unter anderem respiratorische und gastroenterale Erkrankungen, Zystitis, persistierende Harnwegsinfektionen, Hepatitis und Meningoenzephalitis). Bei immunsupprimierten Personen kann eine Infektion zum Tode führen (zur Übersicht: Modrow und Falke, 2002; Wold und Horwitz, 2007). Vereinzelt treten auch in nicht-immunsupprimierten Personen schwerwiegende Infektionen auf. So berichtete z. B. 2007 das *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) vom Auftreten einer neuen Adenovirus Typ 14 Variante in den USA, die schwere respiratorische Erkrankungen in Patienten aller Altersgruppen verursachen kann. Innerhalb von drei Monaten wurden hier 140 Fälle von Ad14-assoziierten Erkrankungen bestätigt, von denen 5% tödlich verliefen (CDC, 2007).

2.1.3 Struktur und Genomorganisation

Aufbau des Virions

Adenoviren bestehen aus einem 80–110 nm großen, ikosaedrischen Proteinkapsid ohne Membranhülle, in dem ein doppelsträngiges, lineares DNA-Genom verpackt ist (Abb. 2.2) (Horne *et al.*, 1959). Die Flächen des Ikosaeders werden in der Hauptsache aus 240 Hexon-Trimeren aufgebaut. An den zwölf Ecken befindet sich jeweils ein Pentamer von Pentonbasisproteinen, an die ein *Fiber* (*Fiber*-Protein-Trimer) gekoppelt ist (Stewart *et al.*, 1993). Diese antennenartigen Fortsätze vermitteln die Adsorption des Virus an die Wirtszelle. Neben den Hexon- und Pentonbasisproteinen sind noch weitere Strukturproteine am Aufbau des Kapsids beteiligt. Im

Inneren des Kapsids bildet das DNA-Genom zusammen mit den *Core*-Proteinen den Nukleoproteinkomplex (*core*).

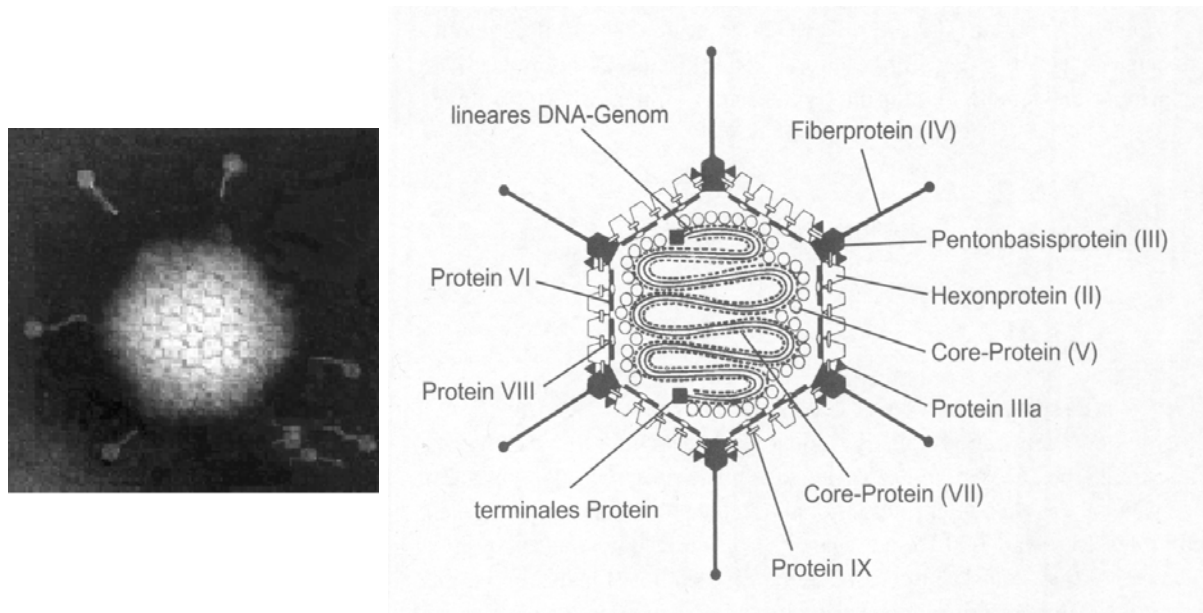


Abb. 2.2: Aufbau des Adenovirus. Links ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Virions zu sehen. Auf der rechten Seite ist der Aufbau des Virus schematisch dargestellt (Darstellung entnommen aus: Modrow und Falke, 2002).

Genomorganisation der humanen Adenoviren

Adenoviren verfügen über ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom von 26–46 kb Länge, das an den Enden von invertierten Sequenzwiederholungen (*inverted terminal repeats*, ITR) flankiert wird. An den 5'-Enden beider DNA-Stränge ist ein terminales Protein gebunden, das für die Initiation der viralen DNA-Replikation benötigt wird (Davison *et al.*, 2003).

Die Organisation des Genoms ist bei den verschiedenen humanen Adenoviren immer sehr ähnlich und wurde ursprünglich anhand der engverwandten Virustypen Ad2 und Ad5 untersucht. Ad5 kodiert etwa 40 verschiedene Regulator- und Strukturproteine, deren Gene in neun Transkriptionseinheiten organisiert sind. Diese werden anhand ihrer Expressionskinetik als frühe (E: *early*; E1A, E1B, E2*early*, E3, E4), intermediäre (IX, IVa2, E2*late*) oder späte (MLTU: *major late transcription unit*) Transkriptionseinheiten bezeichnet. Die späten Gene werden von einem gemeinsamen Promotor (MLP: *major late promoter*) kontrolliert, so dass die entstehenden mRNAs immer das gleiche 5'-Ende besitzen, das als *tripartite leader*-Sequenz (TPL) bezeichnet wird. Aufgrund extensiver Spleißprozesse und der Nutzung unterschied-

licher poly(A)-Stellen lassen sich fünf Gen-Gruppen (L1-L5) unterscheiden. Daneben werden noch Virus-assoziierte RNAs (VA RNAs) gebildet, die eine Rolle bei der Überwindung intrazellulärer Abwehrmechanismen spielen und dabei unter anderem der Translationshemmung durch die Doppelstrang-RNA-abhängige Proteinkinase (RPK) entgegenwirken (zur Übersicht: Berk, 2007).

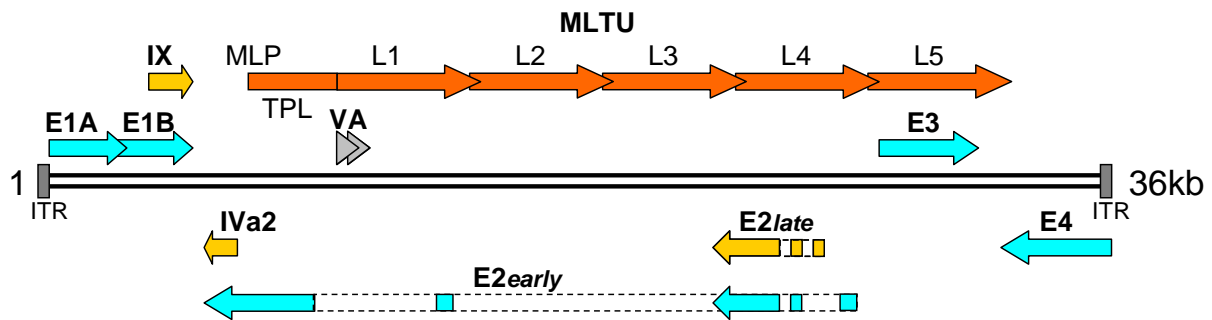


Abb. 2.3: Schematische Darstellung, der Ad5-Genomorganisation. Dargestellt ist die Lage und Orientierung (Pfeilrichtung) der fünf frühen (E1A, E1B, E2_{early}, E3, E4), der drei intermediären (E2_{late}, IX und IVa2) und der späten Transkriptionseinheit (MLTU: *major late transcription unit*). Die späten Gene werden weiter in fünf Gruppen L1-L5 eingeteilt. Darüber hinaus sind im Genom auch noch zwei Virus-assoziierte RNAs (VA) kodiert. MLP: *major late promoter*; TPL: *tripartite leader*; ITR: *inverted terminal repeat*.

2.1.4 Lytischer Replikationszyklus

Die lytische Infektion wird in eine frühe und eine späte Phase unterteilt (Abb. 2.4). Die frühe Phase beginnt mit der Adsorption des Viruspartikels an Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Die *Fiber*-Proteine der Adenovirus-Subgruppen A und C-F interagieren dabei mit dem Coxsackie/Adenovirus Rezeptor (CAR) (Berk, 2007). Die Viren der Subgruppe B binden hingegen an das CD46-Membranprotein. Im Anschluss an die Rezeptor-vermittelten Adsorption kommt es zur Interaktion zellulärer Integrine mit den Pentonbasisproteinen. Dies induziert die Abtrennung der *Fiber*-Proteine und es kommt zur Endozytose der Virionen. Diese werden durch noch weitgehend unbekannte Mechanismen aus den Endosomen freigesetzt und Dynein-abhängig entlang der Mikrotubuli zum Zellkern transportiert. Das virale Genom gelangt anschließend durch die Kernporen in den Nukleus, wo die Synthese der frühen viralen Proteine eingeleitet wird.

Diese Proteine haben die Aufgabe, optimale Bedingungen für die Synthese der Nachkommenviren in der späten Phase zu schaffen, wobei ihre Expression vielfach bis spät in der Infektion anhält.

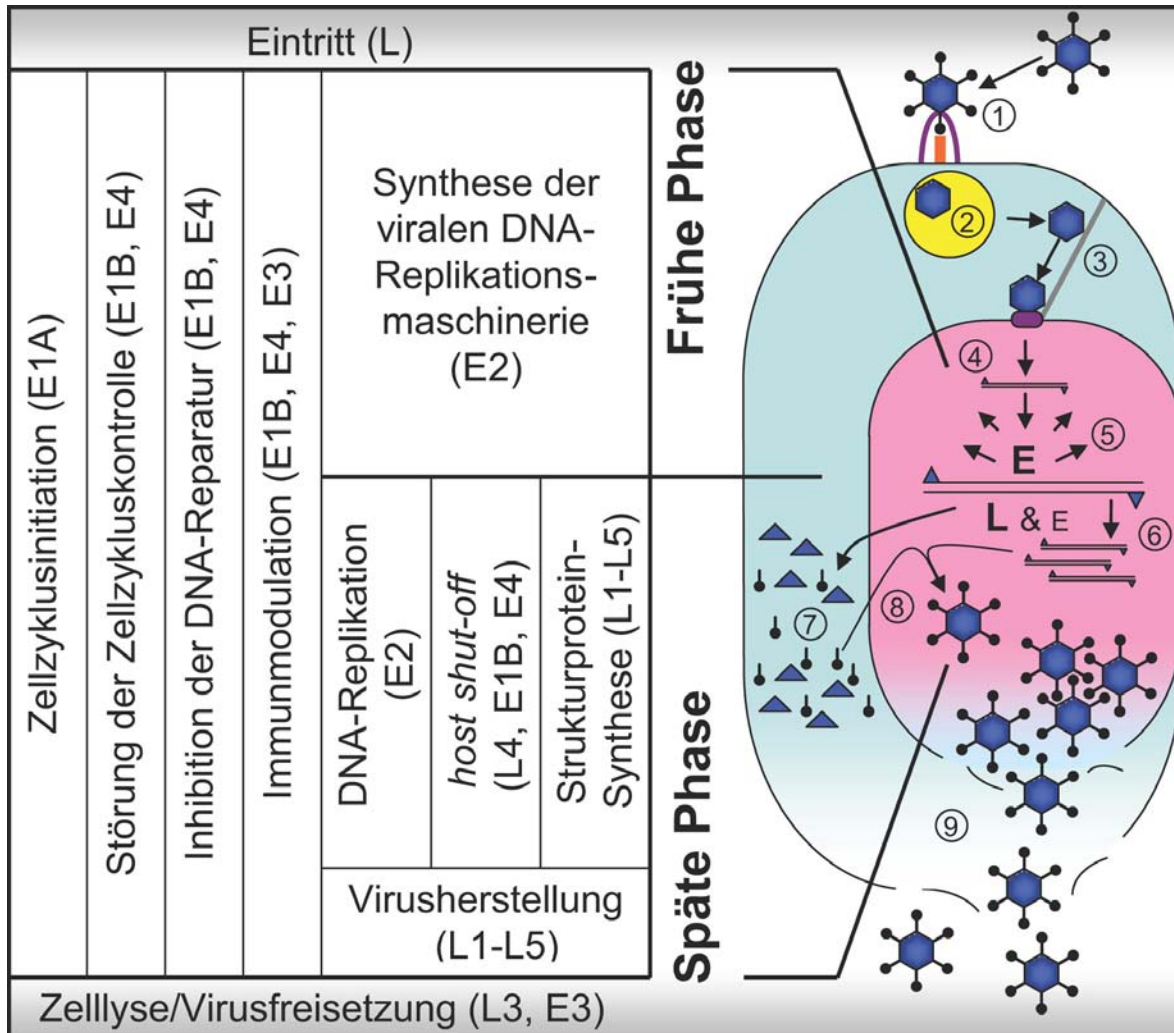


Abb. 2.4: Lytische Infektion durch Adenovirus Typ 5. Die frühe Phase der Infektion beginnt mit der Anheftung viraler *Fiber*-Proteine an Cocksackie/Adenovirus Rezeptoren (1). Die Interaktion zellulärer Integrine mit den Pentonen vermittelt die Endozytose (2). Das Virion entkommt aus dem Endosom und wird an den Mikrotubuli zu den Kernporen transportiert (3). Das Virusgenom wird in den Nukleus entlassen (4). Nachfolgend werden die frühen Genprodukte „E“ gebildet (5), die diverse Aufgaben erfüllen (u.a. Immunevasion, Vorbereiten der virale DNA-Synthese). Mit der viralen DNA-Synthese beginnt die späte Phase der Infektion (6). Neben frühen werden nun auch große Mengen später Proteine „L“ gebildet (7), die meist als Strukturproteine dienen, aber auch am *host shut-off* beteiligt sind. Der Zusammenbau der Viren erfolgt im Kern (8). Die Infektion endet mit der Freisetzung der Nachkommenviren durch Zellyse (9). Einige Funktionen, die für die virale Replikation von Bedeutung sind, wurden auf der linken Bildhälfte eingezeichnet. Die Transkriptionseinheiten, die die hierfür wichtigen Proteine kodieren, sind jeweils in Klammern angegeben. Entsprechend der Phase, in der die Funktionen (hauptsächlich) erfüllt werden, wurden sie oben (frühe Phase), unten (späte Phase) oder durchgängig (frühe und späte Phase) eingezeichnet.

Eine wichtige Funktion der E1A-Proteine ist die Zellzyklusaktivierung durch Vermittlung des S-Phasen-Übergangs, da in ruhenden Zellen wichtige Molekülbau-
steine für die Virusvermehrung fehlen.

Die Proteine der E1B-, E3- und E4-Region gewährleisten u. a. ein Fortlaufen des Zellzyklus und wirken der Apoptose sowie einer Eliminierung der Zelle durch das Immunsystem entgegen (zur Übersicht: Berk, 2005; Burgert *et al.*, 2002; Horwitz, 2001; McNees und Gooding, 2002). Die Proteine der E4-Transkriptionseinheit erfüllen darüber hinaus zahlreiche weitere Funktionen, die zum effizienten Ablauf der viralen Replikation benötigt werden (zur Übersicht: Täuber und Dobner, 2001). Die ebenfalls aktive E2-Region kodiert Faktoren, die für die Replikation des viralen Genoms benötigt werden z.B. die virale DNA-Polymerase und das terminale Protein (zur Übersicht: Berk, 2007).

Mit der viralen DNA-Replikation beginnt *per definitionem* die späte Phase der Infektion. In dieser Phase werden die Genprodukte der intermediären (IX, IVa2, E2*late*) und der späten Transkriptionseinheit (MLTU) in großen Mengen exprimiert. Die intermediären Gene IX und IVa2 sind erst nach dem Beginn der DNA-Synthese aktiv und kodieren zwei kleinere Strukturproteine. Beide Proteine dienen außerdem als Transaktivatoren des MLPs, der für die Transkription der späten Gene verantwortlich ist (Lutz und Kedinger, 1996; Lutz *et al.*, 1997). Die späten Proteine sind größtenteils Strukturproteine des Virions. Jedoch werden auch Faktoren gebildet die z. B. an der Abschaltung der zellulären Proteinsynthese (*host shut-off*) und am Zusammenbau der Nachkommenviren im Kern beteiligt sind (Fessler und Young, 1999; Mathews, 1990). In Zellkultur endet ein lytischer Zyklus nach ca. 24 h mit dem Tod der Zellen. Pro infizierter Zelle werden ca. 10000 Nachkommenviren produziert (Berk, 2007; Modrow und Falke, 2002). Die Lyse wird unter anderem durch die Wirkung des in E3 kodierten *Adenovirus Death Proteins* (ADP) ausgelöst (Tollefson *et al.*, 1996).

2.1.5 Persistente / latente Infektion

Nach Infektion können humane Adenoviren über lange Zeiträume (Monate bis Jahre) aus den betroffenen Geweben in Mandeln oder Darm ausgeschüttet werden

(Fox *et al.*, 1977; Hillis *et al.*, 1973; Nasz *et al.*, 1971; van der Veen und Lambriex, 1973). Nach derzeitigem Erkenntnisstand persistiert das Virus dort in Lymphozyten (Abken *et al.*, 1987; Horvath *et al.*, 1986). Kosulin und Kollegen haben außerdem 2007 adenovirale DNA im Nervengewebe detektiert und postuliert, dass das Virus auch hier persistieren kann (Kosulin *et al.*, 2007). Somit deutet vieles darauf hin, dass Adenoviren generell in der Lage sind eine lang anhaltende, persistierende Virusvermehrung auf niedrigem Niveau oder sogar echte Latenz auszubilden (zur Übersicht: Wold und Horwitz, 2007).

Neuste Daten deuten in der Tat darauf hin, dass zumindest die humanen Adenoviren der Subgruppe C in Lymphozyten latent vorliegen können (Garnett *et al.*, 2002; Mahr *et al.*, 2003; McNees und Gooding, 2002; McNees *et al.*, 2004). Die hierbei zugrunde liegenden Mechanismen sind bislang nicht eindeutig geklärt. Ein aktuelles Modell geht jedoch davon aus, dass das virale Genom in latent infizierten Zellen weitgehend transkriptionell inaktiv ist und mit den Zellen vermehrt wird. Ein Schutz infizierter Zellen vor dem Immunsystem wird dabei durch die induzierbare Expression protektiv-wirkender viraler Proteine sichergestellt. Im Zuge der Immunreaktion wird das zelluläre Protein NF- κ B stimuliert. Dieser Faktor transaktiviert auch den viralen E3-Promotor und es kommt zur Expression immunmodulatorischer adenoviraler Proteine (Fessler *et al.*, 2004; Horwitz, 2004; Lichtenstein *et al.*, 2004; McNees und Gooding, 2002; Windheim *et al.*, 2004).

2.2 Onkogenes Potenzial humaner Adenoviren

1962 konnten Trentin und Mitarbeiter zeigen, dass das humane Adenovirus Typ 12 in neugeborenen Hamstern Tumore induziert. Dies war der erste Hinweis auf ein onkogenes Potenzial humanpathogener Viren (Trentin *et al.*, 1962).

Heute werden humane Adenoviren nach ihrer Onkogenität in drei Gruppen eingeteilt (zur Übersicht: Graham, 1984; Modrow und Falke, 2002; Nevins und Vogt, 2007). Als hochonkogen gelten die Virustypen, die bei kurzer Latenzzeit mit hoher Effizienz Tumore erzeugen. In diese Gruppe gehören die Viren der Subgruppe A, die die Bildung undifferenzierter Sarkome hervorrufen sowie die Virustypen 9 und 10

der Subgruppe D, die in weiblichen Ratten Mammakarzinome verursachen (Ankerst *et al.*, 1974a; Ankerst und Jonsson, 1989; Ankerst *et al.*, 1974b; Javier *et al.*, 1991; Jonsson und Ankerst, 1977). Die als schwach onkogen geltenden Adenoviren der Subgruppe B induzieren nur unregelmäßig, und nach langer Inkubationszeit, undifferenzierte Sarkome. Die überwiegende Mehrheit der humanen Adenoviren (Subgruppe C-F ohne die Virustypen 9 und 10 der Subgruppe D) gilt jedoch in Versuchstieren als nicht onkogen.

Bisher konnte kein Zusammenhang zwischen humanen Adenoviren und der Entstehung menschlicher Tumorerkrankungen festgestellt werden (Chauvin *et al.*, 1990; Mackey *et al.*, 1979; Mackey *et al.*, 1976; Nevins und Vogt, 2007; Wold *et al.*, 1979). Sowohl onkogene als auch nicht-onkogene Adenoviren sind jedoch in der Lage, primäre Nagerzellen in Kultur zu transformieren. Humane Zellen konnten dagegen nur in Ausnahmefällen (meist embryonale Zellen) transformiert werden (Fallaux *et al.*, 1998; Fallaux *et al.*, 1996). Viele dieser transformierten Zellen scheinen dabei neuronalen Ursprungs zu sein (Fallaux *et al.*, 1996; Shaw *et al.*, 2002). Dieser Unterschied zwischen Mensch und Nager weist darauf hin, dass eine abortive Infektion, wie sie in nicht-permissiven Nagerzellen stattfindet, zumindest einer der Faktoren ist, der zur hocheffizienten Transformation beiträgt. Jedoch transformieren subgenomische, nicht-infektiöse DNA-Fragmente humane Zellen ebenfalls deutlich schlechter als Nagerzellen. Dies lässt darauf schließen, dass die verschiedene Transformierbarkeit beider Zellarten wohl nicht ausschließlich durch die Unterschiede in der Permissivität verursacht wird. Ein weiterer Faktor ist sicherlich auch die Tatsache, dass einer Transformation in Nagerzellen scheinbar weniger zelluläre Kontrollmechanismen entgegenstehen als in humanen Zellen und sie sich deshalb generell leichter transformieren lassen (Akagi, 2004). Die Ursachen der unterschiedlichen Transformierbarkeit durch Adenoviren zwischen humanen Zellen und Nagerzellen sind allerdings noch weitgehend unbekannt. Es wurden aber bereits einige Modelle diskutiert (Berk, 2007; Hutton *et al.*, 2000). Ad2- und Ad5-transformierte Zellen (Ad2 und Ad5 gelten als nicht onkogen in Versuchstieren) werden im immunkompetenten Wirtsorganismus hauptsächlich durch zytotoxische T-Zellen erkannt und zerstört (Cook und Lewis, 1987).

Die onkogene Transformation durch Viren kann über verschiedene Mechanismen erfolgen. So kann es im Zuge der Integration der Virus-DNA ins zelluläre Genom zu Mutationen oder epigenetischen Veränderungen kommen, die zur Entartung der Zelle führen (zur Übersicht: Hohlweg *et al.*, 2004; Sourvinos *et al.*, 2000). Daneben existieren auch virale Onkogene, die in die zellulären Kontrollmechanismen eingreifen und zur Tumorentstehung beitragen (zur Übersicht: Gatza *et al.*, 2005). Im Folgenden werden verschiedene Modelle für die Tumorentstehung durch virale Onkogene vorgestellt.

2.2.1 Modelle der viralen Onkogenese

2.2.1.1 Klassisches Modell der viralen Onkogenese

Die Entstehung von Tumoren ist generell ein mehrstufiger, evolutionärer Prozess, in dem auf genetische und epigenetische Veränderungen selektioniert wird, die ein unkontrolliertes Wachstum der Tumorzellen ermöglichen. Zur Erlangung eines vollständig transformierten Phänotyps müssen dabei verschiedene zelluläre Prozesse, wie Zellzykluskontrolle und Apoptosemechanismen dereguliert werden. Dies geschieht häufig durch Mutation von Tumorsuppressoren wie p53 und pRb (Hanahan und Weinberg, 2000). Humane Adenoviren und andere DNA-Tumoviren müssen für eine erfolgreiche Replikation die gleichen Kontrollmechanismen überwinden und tun dies häufig durch Inaktivierung derselben regulatorischen Proteine (Nevins und Vogt, 2007). In der Transformation können virale Onkogene somit als Ersatz für eine Mutation zellulärer Protoonkogene und Tumorsuppressoren dienen (Elgui de Oliveira, 2007; Scheffner *et al.*, 1991).

Dies wird durch das klassische Konzept der viralen Onkogenese beschrieben. Es besagt, dass die dauerhafte Expression viraler Proteine eine Störung zellulärer Funktionen verursacht und so eine Transformation von Zellen induziert. Ferner soll der Verlust der viralen Onkogene zur vollständigen Reversion des transformierten Phänotyps führen (Nevins und Vogt, 2007).

2.2.1.2 „Hit & Run“-Modell der viralen Onkogenese

In der Onkogenese werden wachstumsfördernde Mutationen nicht durch einen gezielten Vorgang induziert, sondern durch das gehäufte Auftreten ungerichteter Veränderungen sowie den anschließenden darwinistischen Selektionsprozess akkumuliert (Anderson, 2001; Heng *et al.*, 2006). So postulierte Loeb 1991, dass es früh in der Tumorentstehung zum Anstieg der Mutationsrate kommen muss, um genügend Veränderungen für die Ausbildung eines vollständig transformierten Phänotyps anzuhäufen (Loeb, 1991). Eine solche genomische Instabilität führt letztlich zu der genetischen Heterogenität, die innerhalb einzelner Tumoren beobachtet werden kann (Macintosh *et al.*, 1998; Vogelstein *et al.*, 1988; Yamasaki *et al.*, 2000).

Es ist bekannt, dass humane Adenoviren und andere DNA-Tumoviren ebenfalls genomische Instabilität erzeugen können (Elgui de Oliveira, 2007; Lavia *et al.*, 2003). Eine virale Transformation durch Induktion genomischer Instabilität kann durch das „Hit & Run“-Modell der Onkogenese beschrieben werden (Skinner, 1976). Dabei führen mutagen-wirkende virale Proteine in der Zelle zu Veränderungen, die einen selbsterhaltenden Transformationsprozess initiieren („Hit“). Im weiteren Verlauf können die viralen Faktoren verloren gehen, ohne dass es zum Verlust des transformierten Phänotyps kommt („Run“). Dieser Prozess weist durch die transiente Anwesenheit eines Mutagens Parallelen zu einer Transformation durch ionisierende Strahlung auf (Huang *et al.*, 2003; Morgan *et al.*, 1996).

Das „Hit & Run“-Modell konnte noch nicht eindeutig bewiesen werden, doch wurden bei der Transformation durch verschiedene Viren immer wieder Beobachtungen gemacht, die auf diesen Mechanismus hindeuten. Neben Adenoviren wurden verschiedene Herpes- (HCMV, EBV, KSHV und HSV), Hepatitis- (B und C), Papilloma- und Polyomaviren (SV40, BCV und JCV) genannt. Für dieselben Viren wurde auch eine Induktion genomischer Instabilität bzw. mutagenes Potenzial gezeigt (Ambinder, 2000; Barbanti-Brodano *et al.*, 2004; Elgui de Oliveira, 2007; Hessein *et al.*, 2005; Iwasaka *et al.*, 1992; Khalili *et al.*, 2003; Kuhlmann *et al.*, 1982; Lomonte und Morency, 2007; Machida *et al.*, 2004; Nevels *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 1997; Si und Robertson, 2006; Skinner, 1976; Tognon *et al.*, 2003).

2.2.2 Transformation durch humane Adenoviren

2.2.2.1 Allgemein

In den meisten Nagetier-Zelllinien, die durch Infektion mit humanen Adenoviren oder durch Transfektion adenoviraler DNA-Fragmente generiert wurden, kommt es zur Integration viraler Sequenzen ins Genom und zur Expression viraler Proteine. Somit scheint der Transformationsprozess in der Regel dem klassischen Konzept der viralen Onkogenese zu entsprechen (zur Übersicht: Graham, 1984). In Abhängigkeit vom Virustyp werden vollständige Genome (Ad9 und Ad12) in ein oder mehreren Kopien oder auch nur Fragmente davon (Ad2 und Ad5) ins Genom der Zellen integriert (zur Übersicht: Brusca *et al.*, 1984; Graham, 1984; Javier *et al.*, 1991). Besondere Bedeutung für die Transformation scheinen dabei die Produkte der E1-Region zu haben, da dieser Bereich konsistent integriert wird (zur Übersicht: Graham, 1984; Tooze, 1981). Darüber hinaus gibt es Hinweise dafür, dass auch E4-Genprodukte zur transformierenden Wirkung humaner Adenoviren beitragen (Täuber und Dobner, 2001). Die einzigen bekannten Ausnahmen stellen hierbei die Virustypen 9 und 10 der Subgruppe D dar, deren gesamtes transformierendes Potenzial in der E4-Region lokalisiert ist (Javier *et al.*, 1992).

Neben solchen „klassisch“ transformierten Zellen wurden aber auch immer wieder Adenovirus-transformierte Zellen beobachtet, in denen keinerlei virale DNA nachweisbar ist. Dies deutet darauf hin, dass auch eine Transformation nach dem „Hit & Run“-Modell möglich ist (Kuhlmann *et al.*, 1982; Nevels *et al.*, 2001; Paraskeva *et al.*, 1982; Paraskeva und Gallimore, 1980; Pfeffer *et al.*, 1999). So ist die transiente Expression von Ad5 E1A und E4orf3 oder E4orf6 (Proteine der E4-Region) ausreichend, um primäre Nagerzellen in Kultur zu transformieren. In so gewonnenen Zellklonen sind häufig keine viralen Sequenzen nachweisbar (Nevels *et al.*, 2001). Daneben wurde auch beobachtet, dass in durch Ad12 transformierten Zellen die viralen Genome nach Transformation verloren gehen können (Kuhlmann *et al.*, 1982; Pfeffer *et al.*, 1999).

2.2.2.2 Adenovirus Typ 5

An der Transformation von Nagerzellen durch Adenovirus Typ 5 sind Produkte der frühen Transkriptionseinheiten E1A und E1B sowie E4 (E4orf3 und E4orf6) beteiligt (Berk, 2007; Endter und Dobner, 2004; Sieber und Dobner, 2007). Dabei können nur die E1A-Genprodukte - unabhängig von anderen viralen Proteinen - die Immortalisierung und teilweise Transformation von Zellen induzieren (Berk, 2007). Durch Interaktion mit den Proteinen der pRb-Familie ist E1A in der Lage den S-Phasenübergang zu initiieren (Dyson und Harlow, 1992; Nevins, 1992; Nevins *et al.*, 1997). E1A aktiviert somit den Zellzyklus in ruhenden Zellen und überwindet die wachstumsinhibitorische Wirkung des Zell/Zell-Kontakts sowie Seneszenz-Signale (zur Übersicht: Berk, 2005; Endter und Dobner, 2004). Im Zuge dieser Veränderungen kommt es zur Induktion und Aktivierung von p53 sowie zur Stimulation p53-abhängiger und -unabhängiger Apoptose, was die transformierende Wirkung von E1A limitiert (Lowe und Ruley, 1993).

Alle weiteren adenoviralen Genprodukte, für die eine Beteiligung am Transformationsprozess gezeigt wurde, wirken in Kooperation mit E1A. Sie tragen vermutlich durch Inhibition von Apoptosemechanismen und/oder Induktion genomischer Instabilität zur effizienten und vollständigen Transformation bei (Graham, 1984; Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997; Nevels *et al.*, 1999; Sieber und Dobner, 2007).

2.3 E1B-Proteine in produktiver Infektion und Transformation

Die Genprodukte der E1B-Transkriptionseinheit der humanen Adenoviren erfüllen essentielle Funktionen in der viralen Replikation und der Adenovirus-vermittelten Transformation.

2.3.1 E1B-Transkriptionseinheit von Adenovirus Typ 5

Das E1B-Gen von Adenovirus Typ 5 (Ad5) kodiert mindestens fünf verschiedene Genprodukte, die mittels einer Gruppe differenziell gespleißter mRNAs hergestellt werden (Abb. 2.5). Die 2,28 kb lange mRNA-Form ist hierbei das Hauptprodukt und enthält zwei überlappende, offene Leserahmen. Im ersten ist das 176 Aminosäuren

(*residues*) große E1B-19K-Protein (E1B-176R) und im zweiten das E1B-55K-Genprodukt (E1B-496R) kodiert. Zur Translation des zweiten Leserahmens wird die interne Initiationsstelle der bicistronischen mRNA genutzt (Bos *et al.*, 1981; Gingeras *et al.*, 1982; Perricaudet *et al.*, 1979).

Neben der 2,28 kb mRNA werden noch weitere, kürzere mRNA-Formen gebildet (Anderson *et al.*, 1984; Lewis und Anderson, 1987; Virtanen und Pettersson, 1985). Während die E1B-19K-kodierende Sequenz davon unbeeinflusst bleibt, gehen Sequenzbereiche im E1B-55K-Leserahmen durch die Spleißprozesse verloren. Diese mRNAs kodieren daher eine Gruppe von mindestens drei verschiedenen Proteinen, deren N-terminale Sequenzbereiche mit den ersten 79 Aminosäuren von E1B-55K identisch sind. Sie werden nach der Anzahl der enthaltenen Aminosäurereste als E1B-156R, E1B-93R und E1B-84R bezeichnet (Anderson *et al.*, 1984; Green *et al.*, 1982; Lewis und Anderson, 1987; Lucher *et al.*, 1984; Takayasu *et al.*, 1994; Virtanen und Pettersson, 1985). Die Proteine werden aufgrund des gemeinsamen E1B-55K N-Terminus im Rahmen dieser Arbeit als „E1BN-Proteine“ zusammengefasst. Während E1B-93R und E1B-84R individuelle C-Termini haben, hat E1B-156R die 77 C-terminalen Aminosäuren mit E1B-55K gemeinsam.

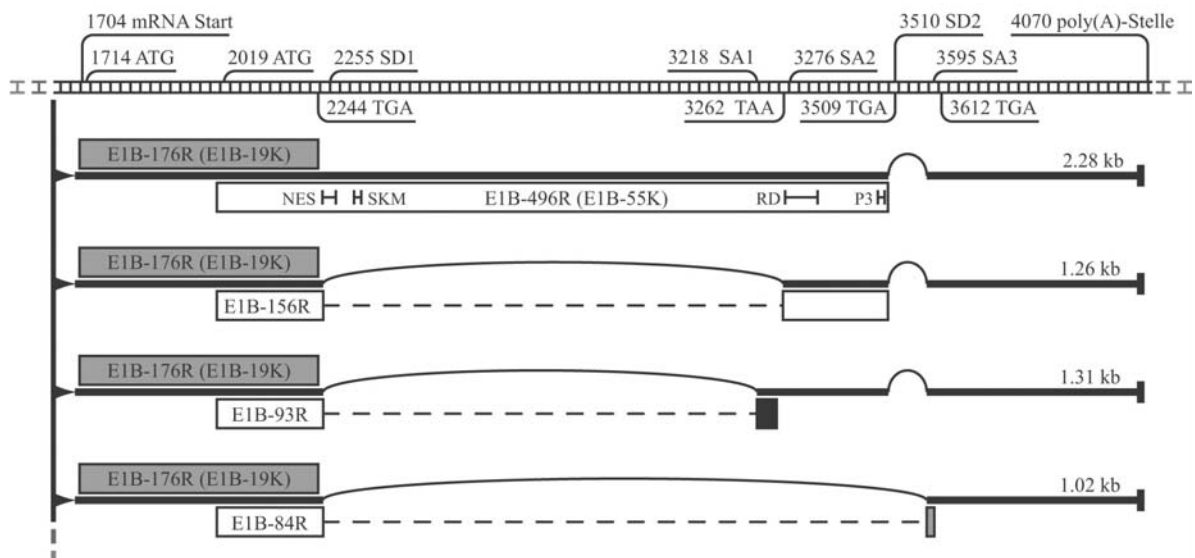


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Ad5 E1B-Transkriptionseinheit. Oben in der Abbildung ist die E1B-Region als Ausschnitt des Ad5-Genoms dargestellt. Motive mit Bedeutung für Transkription und mRNA-Prozessierung sind angegeben und ihre Position im Genom verzeichnet. Darunter sind vier alternativ gespleißte E1B-mRNAs als dicke Linien dargestellt. Ihre Länge ist am rechten Bildrand notiert. Bögen markieren Intronbereiche zwischen Spleißdonor (SD) und Spleißakzeptor (SA). Die offenen Leserahmen der fünf Genprodukte sind als Rechtecke neben der zugehörigen mRNA dargestellt. Die Färbung der

Rechtecke (grau, schwarz und weiß) zeigt das verwendete Leseraster (1-3) an. Die Genprodukte sind nach der Anzahl ihrer Aminosäurereste benannt. Die Leserahmen, die E1B-156R, E1B-93R und E1B-84R kodieren, werden durch Fusion zweier Exons gebildet. Die im Vergleich zu E1B-55K fehlenden Bereiche sind als gestrichelte Linien dargestellt. Innerhalb des E1B-55K-Leserahmens sind die Positionen einiger wichtiger Protein-Motive notiert: Das Kernexportsignal (*nuclear export signal* NES; Aminosäureposition 83-93), das SUMO1 (*small ubiquitin-related modifier 1*) -Konjugationsmotiv (SKM; Aminosäureposition 104-106), die Transkriptionsrepressionsdomäne (RD; um Aminosäureposition 443) und die drei Phosphorylierungsstellen (P3; S490, S491, und T495)

Neben den hier beschriebenen mRNAs werden möglicherweise durch weitere Spleißprozesse noch andere Formen gebildet. So wurde für den mit Ad5 eng verwandten Ad2 eine zusätzliche 0,86 kb-mRNA postuliert, die einen schwachen Spleißdonor nutzt und potenziell zwei Proteine mit 168 bzw. 131 Aminosäuren kodiert (Lewis und Anderson, 1987).

Die Produktion der verschiedenen E1B-mRNAs erfolgt zeitlich reguliert. Diese Beobachtung wurde ursprünglich von verschiedenen Gruppen für Ad2 gemacht und lässt sich auf Ad5 übertragen (Takayasu *et al.*, 1994; Sieber, nicht veröffentlichte Daten).

Während früh in der Infektion hauptsächlich die 2,28 kb-mRNA gebildet wird, nimmt der Anteil der kürzeren Spleißvarianten im Laufe der Zeit zu. In der späten Phase der Virusinfektion dominiert schließlich das E1B-84R kodierende Transkript (Chow *et al.*, 1979; Montell *et al.*, 1984; Spector *et al.*, 1978; Virtanen und Pettersson, 1985; Wilson und Darnell, 1981). Die Expression der zugehörigen Proteine folgt dem Verlauf der mRNA-Produktion. E1B-19K und E1B-55K treten kurz nach den Genprodukten der E1A-Transkriptionseinheit auf und bleiben während des gesamten Infektionszeitraums in großen Mengen detektierbar. Die Produktion von E1B-156R, E1B-93R und E1B-84R beginnt etwas später, jedoch vor der Synthese der späten Proteine, und steigt im Laufe der Zeit an. Während E1B-156R und E1B-84R deutlich nachweisbare Mengen erreichen, ist E1B-93R in humanen Zellen nur schwer nachweisbar (Teodoro und Branton, 1997).

2.3.2 Ad5 E1B-19K und E1B-55K

Eine wichtige Aufgabe von E1B-19K und E1B-55K in der Infektion besteht darin, Zellzyklusarrest und Apoptose zu verhindern, da ein vorzeitiger Tod der Wirtszelle

die virale Replikation beeinträchtigen würde (Cuconati und White, 2002; Wilson und Darnell, 1981). Außerdem tragen beide Proteine vermutlich durch Apoptoseinhibition zur vollständigen, tumorigenen Transformation primärer Nagerzellen in Kooperation mit E1A bei. Sie wirken dabei unabhängig voneinander, jedoch ist ihre Wirkung additiv (McLorie *et al.*, 1991). Unter anderem blockieren sie auf unterschiedlichen Wegen die E1A-induzierte Apoptose (White, 2001). Dies liegt zumindest teilweise in ihrer Fähigkeit begründet, der Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose durch p53 entgegenzuwirken (Berk, 2007).

E1B-19K ist ein virales Homolog der anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine und spielt eine wichtige Rolle bei der Inhibition verschiedener Apoptosewege. Es verhindert die Interaktion der pro-apoptotischen Bcl-2 Proteine Bak und Bax in der Membran der Mitochondrien und blockiert so den mitochondrialen Weg der Caspase-Aktivierung (Berk, 2005).

Die zentrale Aufgabe von E1B-55K in der Transformation scheint die Inaktivierung von p53 zu sein. Man geht heute davon aus, dass die Hauptfunktion von p53 in der Tumorsuppression die transkriptionelle Aktivierung pro-apoptotischer und anti-proliferativer Gene ist (zur Übersicht: Resnick *et al.*, 2005).

E1B-55K interferiert dabei auf mehreren Ebenen mit dem Tumorsuppressor. Es bindet an seine Aktivator-Domäne und unterdrückt so die p53-vermittelte Transaktivierung von Genen. Dies geschieht wahrscheinlich durch sterisches Verdrängen von Koaktivatoren und durch die Wirkung der C-terminalen Transkriptionsrepressionsdomäne von E1B-55K (Martin und Berk, 1998; Martin und Berk, 1999; Teodoro und Branton, 1997; Yew und Berk, 1992; Yew *et al.*, 1994). Der Funktionsmechanismus dieser E1B-55K-Domäne ist noch ungeklärt, jedoch ist bekannt, dass ein zellulärer Kofaktor benötigt wird (Martin und Berk, 1999).

Darüber hinaus sequestriert E1B-55K p53 im Zytoplasma, was ebenfalls zu dessen Inhibition beitragen könnte (Blair Zajdel und Blair, 1988; Endter und Dobner, 2004; Hutton *et al.*, 2000; Zantema *et al.*, 1985; Zhao *et al.*, 2003). Der Tumorsuppressor wird hierbei in kompakte zytoplasmatische Strukturen (*perinuclear bodies*) relokalisiert, bei denen es sich möglicherweise um Zentren des Proteinabbaus - so genannte Aggresomen - handelt (Liu *et al.*, 2005).

Zusammen mit dem E4-Genprodukt E4orf6 ist E1B-55K außerdem in der Lage p53 aktiv dem proteasomalen Abbau zuzuführen. Hierzu bilden die beiden viralen Proteine mit den zellulären Faktoren Elongin B und C, Cullin 5 und Rbx1 einen E3-Ubiquitin-Ligasekomplex, der dem zellulären SCF-E3-Ligasekomplex ähnelt (Blanchette *et al.*, 2004; Harada *et al.*, 2002; Querido *et al.*, 2001). Hierbei vermittelt E4orf6 die Interaktion mit den zellulären Komponenten des Komplexes, während E1B-55K wahrscheinlich als Substratlieferant dient (Blanchette *et al.*, 2004; Harada *et al.*, 2002; Querido *et al.*, 2001).

Der E1B-55K/E4orf6-Komplex führt neben p53 auch noch weitere zelluläre Proteine dem Abbau zu. Dazu zählen auch die Faktoren der DNA-Schadensantwort Mre11 und DNA-Ligase IV (Baker *et al.*, 2007; Mohammadi *et al.*, 2004; Stracker *et al.*, 2002). Der Abbau dieser Faktoren ist für die Virusvermehrung insofern von Bedeutung, als dass die Enden der linearen viralen Genome von der Zelle sonst unter Beteiligung des Mre11/Rad50/NBS1-Komplexes als DNA-Doppelstrangbrüche erkannt werden. Dies würde in der Folge zur Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose führen (Petrini und Stracker, 2003). Ferner käme es unter Beteiligung der DNA-Ligase IV zur Bildung großer Genom-Konkatemere, die nicht mehr in Kapside verpackt werden können, sofern die adenviralen Faktoren E4orf3 oder E1B-55K/E4orf6 diese Reaktionen nicht unterbinden. (Baker *et al.*, 2007; Stracker *et al.*, 2002).

In der späten Phase der Virusinfektion erfüllen E1B-55K und E4orf6 noch eine weitere Funktion, indem sie zum selektiven nukleären Export später viraler Transkripte beitragen (zur Übersicht: Dobner und Kzhyshkowska, 2001). Der hierbei zugrunde liegende Mechanismus ist bislang noch unklar, aber es werden verschiedene Modelle diskutiert. So wurde vorgeschlagen, dass ein Komplex aus E1B-55K und E4orf6 einen zellulären RNA-Transkriptionsfaktor bindet und in die viralen Transkriptions- und Replikationszentren rekrutiert. Auf diese Weise steht der Faktor für die zelluläre Transkription nicht mehr zur Verfügung und es wird selektiv virale RNA transkribiert und exportiert (Ornelles und Shenk, 1991). Ein zellulärer Faktor der hierfür in Frage kommt, ist das E1B-assoziierte Protein 5 (E1B-AP5), das E1B-55K bindet und an der Prozessierung sowie dem Export der mRNA beteiligt ist (Gabler *et al.*, 1998; Izaurralde und Mattaj, 1995). Neueste Daten weisen allerdings

darauf hin, dass auch der Abbau von Proteinen der RNA-Prozessierung bzw. des RNA-Transports eine Rolle spielen könnten. So konnten Woo und Berk 2007 zeigen, dass das Fehlen eines funktionalen E1B-55K/E4orf6-Ubiquitin-Ligasekomplexes den selektiven mRNA-Export verhindert (Blanchette *et al.*, 2008; Woo und Berk, 2007).

2.3.3 Ad5 E1B-156R, E1B-93R und E1B-84R: E1BN-Proteine

Die von alternativ gespleißten E1B-mRNAs kodierten E1BN-Proteine E1B-156R, E1B-93R und E1B-84R scheinen relativ konserviert exprimiert zu werden. Sie wurden für Ad5, Ad2 und andere Vertreter der Subgruppe C der humanen Adenoviren beschrieben. Darüber hinaus finden sich in der Literatur auch Hinweise auf analoge mRNAs und Proteine bei Vertretern der Subgruppen A, B, E und F (Allard und Wadell, 1992; Anderson *et al.*, 1984; Bailey *et al.*, 1993; Dijkema *et al.*, 1982; Lauer *et al.*, 2004; Purkayastha *et al.*, 2005; Stone *et al.*, 2003; Sugisaki *et al.*, 1980; Takayesu *et al.*, 1994). Da auch bei tierpathogenen Adenoviren die Existenz ähnlicher Proteine vermutet wird (Simian Adenovirus 25, Bovine Adenovirus 3, Canine Adenovirus 2), ist denkbar, dass sie ein konserviertes Merkmal der Mastadenoviren darstellen (Farina *et al.*, 2001; Shibata *et al.*, 1989; Zheng *et al.*, 1999).

Besonders auffällig ist dabei die Spleißdonorstelle SD1 (Abb. 2.5) am Ende des ersten Exons. Obwohl sie in einem schlecht konservierten Sequenzbereich liegt (van Ormondt und Hesper, 1983), konnte sie in Vertretern der meisten Subgruppen der humanen Adenoviren nachgewiesen werden (Allard und Wadell, 1992; Anderson *et al.*, 1984; Bailey *et al.*, 1993; Dijkema *et al.*, 1982; Lauer *et al.*, 2004; Purkayastha *et al.*, 2005; Stone *et al.*, 2003; Sugisaki *et al.*, 1980; Takayesu *et al.*, 1994). Sie befindet sich dabei ca. 200–270 bp in 3'-Richtung des E1B-55K-Startkodons und kurz (<40 bp) nach dem Stopkodon des E1B-19K-Leserahmens der entsprechenden Viren.

In Subgruppen, in denen bisher noch keine E1BN-kodierende mRNA-Formen gezeigt wurden, finden sich an ähnlicher Position potenzielle Spleißdonorsequenzen (Tab. 2.1).

Subgruppe (Virustyp)	Sequenz	Konsensussequenz Spleißdonorstelle:	$\begin{matrix} C & A & A & G & T & A & A & G & T \\ A & & & & & & & & G \end{matrix}$	SD1 [bp]
A (Ad12)	..accctgcggtggtggagaagTAAacatggaacaaCAGGTGCAAgaaggccatg..			202
B (Ad7)	..TAGctgacctgtttcctgaactgcgacgggtgcttacTAGGTCTACgaccagtgga..			270
C (Ad5)	..agagccggcctggaccctcgggaaTGAatgttgtaCAGGTGGCTgaactgtatcc..			238
D (Ad9)	..ctggatTGAatCAGGTATCCagcctgtaccagagcttagcAAGGTGCTGa..			250/280
E (Ad4)	..TAGctgacctgtttcctgaactgcaccgggtgctgacTAGGTCTTCgagtggcgg..			249
F (Ad40)	..cctcaacggaattgTAAactgagcctgatcccgaagAGGGTACTAgcagtgggca..			221
G (Ad52)	..aatctgagagccggcctggaccctccagtggaagacTAGGTGCTGaggatgatcct..			203

Tab. 2.1: Die Spleißdonorstelle SD1 ist in den humanen Adenoviren konserviert. Dargestellt sind Ausschnitte aus der kodierenden Sequenz der E1B-55K-Proteine verschiedener humaner Adenoviren. Darin sind die Stopkodons der überlappenden E1B-19K-Leserahmen (rot) sowie die SD1 entsprechenden Spleißdonorsequenzen (Abb. 2.5) markiert. Die grün hervorgehobenen Spleißstellen wurden in der Literatur beschrieben. Blaue Sequenzen stellen aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur eukaryotischen Konsensussequenz (oben) potenzielle Spleißdonorstellen dar. In Fettdruck ist dabei jeweils das GT-Basen-Duplett hervorgehoben, das für die Funktion des Spleißdonors von besonderer Bedeutung ist. Die beobachteten Spleißstellen befinden sich dabei immer kurz nach dem Stopkodon des E1B-19K-Leserahmens (1–38 bp). In der rechten Spalte sind die Positionen der Spleißdonorstellen in der jeweiligen E1B-55K-Sequenz aufgeführt.

Während die Funktionen von E1B-19K und E1B-55K intensiv untersucht worden sind, ist über die E1BN-Proteine nur sehr wenig bekannt. Bisher ist noch unklar, ob und wenn ja, welche Funktionen sie erfüllen (Lewis und Anderson, 1987; Montell *et al.*, 1984; Takayesu *et al.*, 1994).

Die Tatsache, dass sie von diversen Mastadenoviren exprimiert werden und dass ihr Auftreten zeitlich reguliert ist, deutet jedoch auf mögliche Funktionen in der Infektion hin. Die enge Verwandtschaft der E1BN-Proteine mit dem potenten Onkoprotein E1B-55K könnte darüber hinaus auf ein transformierendes Potenzial hinweisen.

2.4 Aufgabenstellung

Die Ad5 E1B-Proteine erfüllen wichtige Funktionen in der Infektion sowie der adenoviralen Transformation und sind Ziel intensiver Forschung. E1B-55K wirkt unter anderem durch Inhibition von p53 und führt in Kooperation mit Ad5 E4orf6 den Tumorsuppressor sowie weitere zelluläre Faktoren dem proteasomalen Abbau zu. Trotz aller detaillierten Kenntnisse scheint das aktuelle Bild der Ad5 E1B-Funktionen jedoch unvollständig zu sein, da auch drei Isoformen von E1B-55K (E1BN-Proteine) gebildet werden, deren Funktionen bisher gänzlich unbekannt ist.

Ziel der Arbeit ist es daher zu klären, ob diese Proteine (E1B-156R, E1B-93R und E1B-84R) funktional sind und erste Untersuchungen möglicher Aktivitäten durchzuführen. Hierzu sollen Virusmutanten generiert werden, die Defekte in der Bildung der E1BN-Proteine aufweisen. Diese Viren sollen bezüglich der Produktion infektiöser Nachkommenviren sowie der Synthese viraler Strukturproteine getestet werden. Da eine Beeinflussung von E1B-55K durch die E1BN-Proteine vermutet wird, soll auch dessen Gleichgewichtsmenge und Lokalisation im Infektionsverlauf erfasst werden. Ferner soll bestimmt werden, ob Defekte im E1B-55K/E4orf6-vermittelten proteasomalen Abbau zellulärer Faktoren auftreten. Da E1B-55K zur Erfüllung dieser und anderer Funktionen auf die Verfügbarkeit von E4orf6 angewiesen ist, sollen auch dessen Gleichgewichtsmenge erfasst werden.

Bei der Untersuchung der E1BN-Proteine ist E1B-156R von besonderem Interesse, da das Protein denselben C-Terminus wie E1B-55K besitzt und dieser Bereich im Voll-längenprotein wichtig für transformationsfördernde und transkriptionsreprimierende Wirkungen ist. Da somit denkbar ist, dass auch E1B-156R über solche Aktivitäten verfügt, kann das Protein gezielt dahingehend untersucht werden. So soll getestet werden, ob E1B-156R in Kooperation mit E1A transformationsfördernd wirken kann. Ist dies der Fall, sollen Zelllinien isoliert und charakterisiert werden. Anschließend soll bestimmt werden, ob E1B-156R zur Transformationsförderung dieselben Mechanismen nutzt wie E1B-55K. Auch eine denkbare Funktion von E1B-156R als Transkriptionsrepressor sowie eine Kooperation mit E4orf6 bei der Induktion des p53-Abbaus soll untersucht werden. Da vorstellbar ist, dass E1B-156R einen Einfluss auf E1B-55K ausüben kann, soll ferner überprüft werden, ob es mit dem Voll-längenprotein wechselwirkt und die E1B-55K-vermittelt Transkriptionsrepression modulieren kann.

3 MATERIAL

3.1 Zellen

3.1.1 Bakterienstämme

Zur Klonierung rekombinanter DNA und Amplifikation von Plasmiden wurden die *E. coli*-Stämme DH5 α und DH10B verwendet. Bei Arbeiten mit Ad5-Bacmiden wurden *E. coli* XL1-BLUE und XL2-BLUE benutzt.

BEZEICHNUNG	GENOTYP
DH5 α	<i>supE44, ΔlacU169, (ϕ80dlacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i> (Hanahan, 1983)
DH10B	<i>F'araD139, Δ(ara, leu)7697, ΔlacX174, galU, galK, mcrA, Δ(mrr, hsdR, mcrBC), rspL, deoR, (ϕ80dlacZΔM15), endA1, nup5, recA1</i> (Gibco BRL)
XL1-BLUE	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F'proAB, lacI^qZΔM15, Tn10 (Tet^r)]</i> (Bullock <i>et al.</i> , 1987)
XL2-BLUE	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F'proAB, lacI^qZΔM15, Tn10 (Tet^r), Amy, Cam^r]</i> (Bullock <i>et al.</i> , 1987)

3.1.2 Säugerzellen

In den verschiedenen Experimenten und zur Virusanzucht wurden die unten aufgeführten Zellen verwendet. Darunter sind auch Zelllinien, die im Rahmen dieser Arbeit durch Transformation primärer BRK-Zellen gewonnen wurden. In der ersten Spalte ist jeweils die Nummer der Zelllinie in der *Filemaker Pro*-Datenbank der Arbeitsgruppe angegeben.

#	BEZEICHNUNG	MERKMAL
-	BRK	Primäre Nierenzellen aus 3-5 Tage alten Sprague-Dawley-Ratten
7	H1299	Humane, p53-negative Lungenkarzinom-Zelllinie (Mitsudomi <i>et al.</i> , 1992)
8	A549	Humane Lungenkarzinom-Zelllinie; Wildtyp p53 (Giard <i>et al.</i> , 1973)
20	911	Humane embryonale Retinoblastom-Zelllinie; Ad5-transformiert; E1-Proteine nachweisbar (Fallaux <i>et al.</i> , 1996)

59	HEK-293	Humane embryonale Nierenzelllinie; Ad5-transformiert; E1-Proteine nachweisbar (Graham <i>et al.</i> , 1977)
120	AB120	BRK-Zelllinie; Ad5 E1A/E1B-55K-transformiert; virale Proteine nachweisbar (Endter <i>et al.</i> , 2001)
128	A4	BRK-Zelllinie; Ad5 E1A-12S-transformiert.; E1A-Protein nachweisbar (Sieber und Dobner, 2007)
135	AB7	BRK-Zelllinie; Ad5 E1-Region-transformiert; E1A- und E1B-Proteine nachweisbar (Nevels <i>et al.</i> , 1999)
206	ABS1	BRK-Zelllinie; Ad5 E1A/E1B-55K/E4orf6-transformiert; virale Proteine nachweisbar (Nevels <i>et al.</i> , 1999)
376	BRK1	Spontan immortalisierte BRK-Zellen (Endter <i>et al.</i> , 2005)
605	AB605	BRK-Zelllinie; Ad5 E1A/E1B-156R-transformiert; E1B-156R-Sequenz integriert und E1B-156R-Protein nachweisbar (diese Arbeit)
606	AB606	BRK-Zelllinie; Ad5 E1A/E1B-156R-transformiert; E1B-156R-Sequenz integriert und E1B-156R-Protein nachweisbar (diese Arbeit)
627	AB627	BRK-Zelllinie; Ad5 E1A/E1B-156R-transformiert; E1A-Sequenz integriert und E1A-Protein nachweisbar (diese Arbeit)
628	AB628	BRK-Zelllinie; Ad5 E1A/E1B-156R-transformiert; E1A-Sequenz integriert und E1A-Proteine nachweisbar (diese Arbeit)
629	AB629	BRK-Zelllinie; Ad5 E1A/E1B-55K-transformiert; weder Integration viraler DNA noch Nachweis viraler Proteine möglich (diese Arbeit)
632	AB632	BRK-Zelllinie; Ad5 E1A/E1B-156R-transformiert; E1A-Sequenz integriert und E1A-Proteine nachweisbar (diese Arbeit)
634	AB634	BRK-Zelllinie; Ad5 E1A/E1B-156R-transformiert; E1A- und E1B-156R-Sequenz integriert und E1A-Proteine nachweisbar (diese Arbeit)
635	AB635	BRK-Zelllinie; Ad5 E1A/E1B-156R-transformiert; E1A-Sequenz integriert und E1A-Proteine nachweisbar (diese Arbeit)
637	AB637	BRK-Zelllinie; Ad5 E1A/E1B-156R-transformiert; E1A-Sequenz integriert und E1A-Proteine nachweisbar (diese Arbeit)
638	AB638	BRK-Zelllinie; Ad5 E1A/E1B-156R-transformiert; E1A- und E1B-156R-Sequenzen integriert; virale Proteine nicht nachweisbar (diese Arbeit)

3.2 Nukleinsäuren

3.2.1 Oligonukleotide

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Oligonukleotide zur Durchführung von Sequenzierungen (Seq.), für PCR-Amplifikationen (PCR) und zur Einführung von Mutationen (Mut.) durch gerichtete Mutagenese verwendet. Spezifisch in die Oligonukleotide eingefügte Restriktionsschnittstellen oder Basenaustausche sind unter-

strichen. Alle Oligonukleotide wurden bei Metabion bezogen. In der ersten Spalte ist die Nummer des jeweiligen Oligonukleotids in der *Filemaker Pro*-Datenbank der Arbeitsgruppe angegeben.

#	BEZEICHNUNG	SEQUENZ	VERWENDUNG
110	E1B 361-389 rev	CGG TGT CTG GTC ATT AAG CTA AAA	Seq.
112	E1B 1197-1215 fwd	CGG TAA CAG GAG GGG GGT G	Seq.
330	E1Abp 626 fwd	CCG AAG AAA TGG CCG CCA GTC TTT TGG ACC AGC	PCR.
641	E1B55K-PCR-rev	GCC AAG CAC CCC CGG CCA CAT ATT TAT CAT GC	Seq.
782	Seq E1-Box fwd	CAA GGA TAA TTG CGC TAA TGA GC	Seq.
783	Seq E1-Box rev	CCA CAC TCG CAG GGT CTG C	Seq.
1003	E1Bmt(<i>Bam</i> HI)fwd	CGG <u>GAT</u> <u>CCA</u> TGG AGC GAA GAA ACC	PCR, Seq.
1004	E1Bmt(<i>Eco</i> RI)rev	CGG <u>AAT</u> <u>TCC</u> TCA ATC TGT ATC TTC ATC G	PCR, Seq.
1020	E1BdelP Ad5 fwd	CGC GCT GAG TTT GGC <u>GCT</u> <u>GCC</u> GAT GAA GAT <u>GCA</u> GAT TGA GGT ACT G	Mut.
1021	E1BdelP Ad5 rev	CAG TAC CTC AAT CTG <u>CAT</u> CTT CAT CGG <u>CAG</u> <u>CGC</u> CAA ACT CAG CGC G	Mut.
1142	E1BDo2255fwd	CGG GAA TGA ATG TTG TAC <u>AAG</u> <u>TCG</u> <u>CAG</u> AAC TGT ATC CAG AAC TG	Mut.
1143	E1Bdo2255rev	CAG TTC TGG ATA CAG TTC <u>IGC</u> <u>GAC</u> <u>ITG</u> TAC AAC ATT CAT TCC CG	Mut.
1144	55k2xSfwd	GGC TGA ACT GTA TCC <u>AIA</u> ACT <u>GIG</u> ACG CAT TTT GAC AAT TAC AG	Mut.
1145	55k2xSrev	CTG TAA TTG TCA AAA TGC GTC <u>ACA</u> GTT <u>ATG</u> GAT ACA GTT CAG CC	Mut.
1146	93Rakzfwd	CAT TTG GGT AAC <u>CGG</u> <u>CGG</u> GGG GTG TTC CTA C	Mut.
1158	93Rakzrev	GTA GGA ACA CCC <u>CCC</u> <u>GCC</u> <u>GGT</u> TAC CCA AAT G	Mut.
1159	156Rakzfwd	CTA AGA TAT TGC TTG <u>AAC</u> CCG AGA GCA TGT CCA AG	Mut.
1160	156Rakzrev	CTT GGA CAT GCT CTC GGG <u>ITC</u> AAG CAA TAT CTT AG	Mut.
1283	E1B84R(<i>Eco</i> RI)rev	CGG <u>AAT</u> <u>TCG</u> AGT TGG TGC TCA TGG C	PCR, Seq.
1284	E1AgPCRrev	CTC GGG CTC AGG CTC AGG TTC AGA CAC AGG	PCR
1309	84Rkofwd	GTA TCT GTT TTG CAG CAG <u>TGA</u> CCG CCG CCA TGA GCA CC	Mut.
1310	84Rkorev	GGT GCT CAT GGC GGC GGI <u>CAC</u> TGC TGC AAA ACA GAT AC	Mut.
1417	ΔSA2.2fwd	GAT ATT GCT TGA ACC CGA <u>ATC</u> CAT GTC CAA GGT GAA CCT GAA CG	Mut.
1418	ΔSA2.2rev	CGT TCA GGT TCA CCT TGG ACA TGG <u>ATT</u> CGG GTT CAA GCA ATA TC	Mut.

3.2.2 Vektoren

Folgende Vektoren wurden für Subklonierungen oder in Transfektionsexperimenten verwendet. In der ersten Spalte ist die Nummer des Konstrukts in der *Filemaker Pro*-Datenbank der Arbeitsgruppe angegeben.

#	BEZEICHNUNG	VERWENDUNG	REFERENZ
129	pSG424.TCC	Säugerzell-Expressionsvektor; Fusionsproteine mit N-terminaler Gal4-DB; modifizierter Polylinker	(Sadowski und Ptashne, 1989)
136	pcDNA3	Säugerzell-Expressionsvektor; CMV-Promotor	Invitrogen
152	pCMX3b	Säugerzell-Expressionsvektor; CMV-Promotor; Fusionsproteine mit N-terminalem Flag-Epitop	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
155	pcDNA3-HA	abgeleitet von pcDNA3; CMV-Promotor; Fusionsproteine mit N-terminalem HA-Epitop	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
180	pRL-TK	Renilla-Luziferase Expression; HSV-TK-Promotor	Promega

3.2.3 Rekombinante Plasmide

Folgende rekombinante Plasmide wurden im Rahmen der Arbeit verwendet bzw. hergestellt. In der ersten Spalte ist die Nummer des Plasmids in der *Filemaker Pro*-Datenbank der Arbeitsgruppe angegeben.

#	BEZEICHNUNG	BESCHREIBUNG	REFERENZ
2	pC53-SN3	basierend auf pCMVneo; Insert: Humanes p53	(Baker <i>et al.</i> , 1990)
96	pCMV-E1A 12S	basierend auf pCMVneo; Insert: Ad5 E1A 12S	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
107	pGal4E1B-55K	basierend auf pSG424; Insert: Ad5 E1B-55K; Exprimiert Gal4-BD-E1B-55K Fusionsprotein	(Dobner <i>et al.</i> , 1996)
375	pGalTK-Luc	<i>Firefly</i> -Luziferase Expression; artifizieller HSV-TK-Promotor mit vier Gal4-DB-Bindungssequenzen	(Nevels <i>et al.</i> , 1997)
499	pRE-LUC	<i>Firefly</i> -Luziferase Expression; artifizieller p53-abhängiger CMV-IE-Promotor	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
608	pXC15	basierend auf pML; Insert: Ad5 E1-Region	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
715	pcDNA3-HA-E4orf6	basierend auf pcDNA3-HA; Insert: Ad5 E4orf6	Stammsammlung der Arbeitsgruppe

737	pE1A	basierend auf pML; Insert: Ad5 E1A-12/13S	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1235	E1-Box	Ad5 E1-Region in pPG-S3	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1319	pE1B-55K	basierend auf pcDNA3, Insert: Ad5 E1B-55K	(Nevels <i>et al.</i> , 2001)
1326	pE1B-156R	basierend auf pcDNA3; Insert: Ad5 E1B-156R	diese Arbeit
1327	pE1B-93R	basierend auf pcDNA3; Insert: Ad5 E1B-93R	diese Arbeit
1375	pGal4E1B-156R	basierend auf pSG424; Insert: Ad5 E1B-156R; exprimiert Gal4-BD-E1B-156R Fusionsprotein	diese Arbeit
1383	E1-Box (TNEX6)	basierend auf E1-Box; enthält stille Mutation, die Transposon-Integration (TN10) verhindert	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1385	E1-Box ΔSD	basierend auf TNEX6; Spleißstelle SD1 durch Mutation inaktiviert	diese Arbeit
1386	E1-Box 55K⁻	basierend auf TNEX6, E1B-55K- <i>orf</i> mit zwei Stopkodons unterbrochen	diese Arbeit
1387	E1-Box ΔSA1	basierend auf TNEX6; Spleißstelle SA1 durch Mutation inaktiviert	diese Arbeit
1388	E1-Box ΔSA2	basierend auf TNEX6; Spleißstelle SA2 durch Mutation inaktiviert	diese Arbeit
1415	pE1B-55K ΔSD	basierend auf pE1B-55K; Spleißstelle SD1 durch Mutation inaktiviert	diese Arbeit
1467	pHH0.34-TK-Luc	<i>Firefly</i> -Luziferase Expression; p53-abhängiger CyclinG/HSV-TK-Promotor	(Okamoto und Beach, 1994)
1578	pCMX3b-E1B-156R	basierend auf pCMX3b; Insert: E1B-156R exprimiert Flag-E1B-156R Fusionsprotein	diese Arbeit
1607	phDaxx-HA	basierend auf pcDNA3; Insert: HA-hDaxx	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1641	pE1B-84R	basierend auf pcDNA3; Insert: Ad5 E1B-84R	diese Arbeit
1652	pE1B-156RdP	basierend auf pE1B-156R; Phosphorylierungsstellen mutiert (S150A, S151A, T155A)	diese Arbeit
1680	E1-Box E1B⁻	basierend auf E1-Box; E1B-55K- und E1BN- <i>orfs</i> mit vier Stopkodons unterbrochen	diese Arbeit
1683	E1-Box 84RΔC	basierend auf TNEX6, E1B-84R- <i>orf</i> mit Stopkodons unterbrochen	diese Arbeit
1964	E1-Box ΔSA2.2	basierend auf E1-Box ΔSA2; kryptische Spleißakzeptorstelle SA2.2 in E1B-55K <i>orf</i> inaktiviert	diese Arbeit

3.2.4 Bacmide

Folgende Bacmide wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und/oder zur Gewinnung rekombinanter Adenoviren verwendet. In der ersten Spalte ist die

Nummer des Konstrukts in der *Filemaker Pro*-Datenbank der Arbeitsgruppe angegeben.

#	BEZEICHNUNG	BESCHREIBUNG
1154	Ad5pPG-S2 (Noah)	Ad5-Genom mit Deletion (nt 28593-30471) der E3-Region und zusätzlicher BstBI Schnittstelle an Position 30955 (basierend auf Ad5-Sequenz; PubMed <i>Accession Code</i> : AY339865) (Stammsammlung der Arbeitsgruppe)
1384	Ad5pPG-S2 (Sem)	basierend auf Ad5pPG-S2 (Noah); E1-Region aus TNEX6 (Stammsammlung der Arbeitsgruppe)
1392	Ad5pPG-S2 (ΔSD)	basierend auf Ad5pPG-S2 (Noah); E1-Region aus E1-Box Δ SD (diese Arbeit)
1393	Ad5pPG-S2 (55K⁻)	basierend auf Ad5pPG-S2 (Noah); E1-Region aus E1-Box 55K ⁻ (diese Arbeit)
1394	Ad5pPG-S2 (ΔSA1)	basierend auf Ad5pPG-S2 (Noah); E1-Region aus E1-Box Δ SA1 (diese Arbeit)
1395	Ad5pPG-S2 (ΔSA2)	basierend auf Ad5pPG-S2 (Noah); E1-Region aus E1-Box Δ SA2 (diese Arbeit)
1697	Ad5pPG-S2 (84RΔC)	basierend auf Ad5pPG-S2 (Noah); E1-Region aus E1-Box 84R Δ C (diese Arbeit)
1696	Ad5pPG-S2 (E1B⁻)	basierend auf Ad5pPG-S2 (Noah); E1-Region aus E1-Box E1B ⁻ (diese Arbeit)

3.3 Adenoviren

Folgende rekombinante Adenoviren wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und/oder verwendet. In der ersten Spalte ist die Nummer des Konstrukts in der *Filemaker Pro*-Datenbank der Arbeitsgruppe angegeben.

#	BEZEICHNUNG	BESCHREIBUNG
70	<i>dl1520</i>	Ad2/Ad5-chimäres Virus mit Deletion (nt 2496-3323) und Stopkodon an Position 3 in E1B-55K- <i>orf</i> (Barker und Berk, 1987)
80	H5<i>dl309</i>	Ad5 Wildtyp mit Deletion (nt 30005-30750) der E3-Region (Jones und Shenk, 1979)
100	H5pg4100 (Noah)	basierend auf Bacmid Ad5pPG-S2 (Noah) (Groitl und Dobner, 2007)
128	H5pm4128 (ΔSD)	basierend auf Bacmid Ad5pPG-S2 (Δ SD) (diese Arbeit)

129	H5pm4129 (55K⁻)	basierend auf Bacmid Ad5pPG-S2 (55K ⁻) (diese Arbeit)
130	H5pm4130 (ΔSA1)	basierend auf Bacmid Ad5pPG-S2 (Δ SA1) (diese Arbeit)
131	H5pm4131 (ΔSA2)	basierend auf Bacmid Ad5pPG-S2 (Δ SA2) (diese Arbeit)
132	H5pm4132 (wt)	basierend auf Bacmid Ad5pPG-S2 (Sem) (diese Arbeit)
149	H5pm4149 (E1B⁻)	basierend auf Bacmid Ad5pPG-S2 (E1B ⁻) (diese Arbeit)
162	H5pm4162 (84RΔC)	basierend auf Bacmid Ad5pPG-S2 (84R Δ C) (diese Arbeit)

3.4 Antikörper

Im Folgenden sind die Antikörper aufgeführt, die für *Western Blot*-Analysen, Immunpräzipitationen und Immunfluoreszenzen verwendet wurden. Mit „PK“ sind dabei polyklonale und mit „MK“ monoklonale Antikörper gekennzeichnet.

3.4.1 Primärantikörper

#	BEZEICHNUNG	ANTIGEN	SPEZIFIKATION
54	FL-393	humanes p53	PK IgG (Kaninchen); gereinigt (Santa Cruz)
62	DO-1	humanes p53	MK IgG (Maus); gereinigt (Santa Cruz)
88	AC-15	β -actin	MK IgG1 (Maus); gereinigt (Sigma)
94	RSA3	Ad5 E4orf6	MK IgG (Maus); Hybridom-Überstand (Marton <i>et al.</i> , 1990)
113	B6-8	Ad5 E2A	MK IgG (Maus); Hybridom-Überstand (Reich <i>et al.</i> , 1983)
130	2A6	Ad5 E1B-55K N-Terminus	MK IgG (Maus); Hybridom-Überstand (Sarnow <i>et al.</i> , 1982)
131	M73	Ad5 E1A	MK IgG (Maus); Hybridom-Überstand (Harlow <i>et al.</i> , 1985)
196	M2	Flag-Epitop	MK IgG (Maus); gereinigt (Sigma)
229	7C11	Ad5 E1B-55K C-Terminus	MK IgG (Ratte); Hybridom-Überstand (Kinds Müller <i>et al.</i> , 2007)
246	α-Late	Ad5 Struktur- proteine	PK Antikörper (Kaninchen); Serum (Zeller, 2003)
248	ab499	humanes Rad50	PK IgG (Kaninchen); gereinigt (Abcam)
256	ab397	humanes Mre11	PK IgG (Kaninchen); gereinigt (Abcam)
353	Anti-pIX	Ad5 pIX	PK IgG (Kaninchen) (Lutz <i>et al.</i> , 1997)
370	Anti-Daxx	humanes Daxx	PK IgG (Kaninchen); gereinigt (Nr. 07-471; Upstate)
379	1807	Ad5 E4orf6	PK IgG (Kaninchen); Hybridom-Überstand (Boivin <i>et al.</i> , 1999)

3.4.2 Sekundärantikörper

Folgende Sekundärantikörper wurden bei *Western Blot*-Analysen verwendet:

BEZEICHNUNG	EIGENSCHAFTEN
HRP-Anti-Maus	IgG (Schaf) Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt; Antigen: Maus IgG; 1:5000 (Amersham Life Science)
HRP-Anti-Ratte	IgG (Ziege) Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt; Antigen: Ratte IgG; 1:5000 (Amersham Life Science)
HRP-Anti-Kaninchen	IgG (Esel) Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt; Antigen: Kaninchen IgG; 1:5000 (Amersham Life Science)

Folgende Sekundärantikörper wurden bei Immunfluoreszenz-Analysen verwendet:

BEZEICHNUNG	EIGENSCHAFTEN
FITC-Anti-Ratte	IgG (Esel) Fluorescein-isothiocyanat-gekoppelt; Antigen: Ratte IgG; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (Dianova)
FITC-Anti-Maus	IgG (Esel) Fluorescein-isothiocyanat-gekoppelt; Antigen: Maus IgG; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (Dianova)
FITC-Anti-Kaninchen	IgG (Esel) Fluorescein-isothiocyanat-gekoppelt; Antigen: Kaninchen IgG; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (Dianova)
Texas Red-Anti-Ratte	IgG (Esel) <i>Texas Red</i> -gekoppelt; Antigen: Ratte IgG; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (Dianova)
Texas Red-Anti-Maus	IgG (Esel) <i>Texas Red</i> -gekoppelt; Antigen: Maus IgG; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (Dianova)
Texas Red-Anti-Kaninchen	IgG (Esel) <i>Texas Red</i> -gekoppelt; Antigen: Kaninchen IgG; AffiniPure-gereinigtes Gesamtmolekül (Dianova)
AlexaTM 488 Anti-Maus	IgG (F[ab'] ₂ -Fragment; Ziege) Alexa TM 488-gekoppelt; Antigen: Maus IgG; (Molecular Probes)

3.5 Molekularbiologische und biochemische Materialien

3.5.1 Größen- und Molekulargewichtsstandards

Zur Größenbestimmung von DNA-Molekülen in Agarosegelen wurden die Standards *1 kb ladder* bzw. *100 bp ladder* von Gibco BRL verwendet. Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen in SDS-Gelen wurde der *Precision Protein Standard* (BioRad) eingesetzt.

3.5.2 Kommerzielle Systeme

PRODUKT	VERWENDUNG	HERSTELLER
<i>Dual-Luciferase® Reporter Assay System</i>	Transkriptions-Reporter-Versuch	Promega
<i>Gel Extraction Kit</i>	DNA-Isolierung	Qiagen
<i>Glow Mounting Medium</i>	Versiegelung von Immunfluoreszenzproben	EnerGene
GBX-Entwickler & Fixierer	Entwicklung von Röntgenfilmen	Kodak
Plasmid Mini & Maxi Kit	Plasmid-Isolierung	Qiagen
<i>Protein-Assay</i>	Bestimmung der Proteinkonzentration	BioRad
<i>QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	DNA-Mutagenese	Stratagene
<i>RNeasy Mini Kit</i>	RNA-Isolierung	Qiagen
<i>SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate</i>	<i>Western Blot</i> -Analysen	Pierce
Vivapure® AdenoPack 20	Isolierung und Konzentration von Ad5	Sartorius

3.5.3 Enzyme

PRODUKT	HERSTELLER
Kollagenase/Dispase	Roche
Restriktionsendonukleasen (diverse)	Roche & New England Biolabs
Thermosensitive alkalische Phosphatase	Roche
Taq-DNA-Polymerase	Roche
DNase I	Roche
RNase A	Roche
RNase T1	Roche
Superscript II RNase H-Reverse Transkriptase	Gibco BRL
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs

3.5.4 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien, wurden von den Firmen AppliChem, Merck, Sigma, ICN, FMC Bioproducts, Difco Laboratories, Medco, Roche, Gibco BRL, Roth, Fluka, PAN, Invitrogen, Biomol, USB, Polysciences, Töpfer oder JT Baker bezogen.

3.6 Labormaterialien

3.6.1 Laborgeräte

GERÄT	HERSTELLER
<i>Blot-Apparatur, Trans-Blot® Electrophoretic Transfere Cell</i>	BioRad
Brutschrank (Bakterien)	Heraeus Instruments
CO ₂ -Inkubator (Zellkultur)	Heraeus Instruments
Cryo-Einfriergerät „Mr. Frosty“	Zefa Laborservice
Elektroporationsapparatur, MicroPulser™	BioRad
Filmkassette	Rego
Flachbettgelapparatur (Agarosegele)	H. Hölzel
Flachbettscanner, scanjet 7400c,	Hewlett-Packard
Fluoreszenzmikroskop Leica DM RX, Aufrecht	Leica
Geldokumentationssystem Gel Print 2000i	MWG Biotech
Inkubationsschüttler (Bakterien)	New Brunswick
Laminar Flow	BDK
Lichtmikroskop Leica DM IL, Invers	Leica
Mikrowelle	Moulinex
PCR-Gerät, Peltier <i>Thermal Cycler</i> PTC-200	MJ Research
pH-Meter, pH 530	WTW
SDS-Gelaparatur (Multigel und Multigel Long)	Biometra
Spectrometer, Lambda 25, UV/VIS	Perkin Elmer
Spectrophotometer, SmartSpec™ Plus	BioRad
Sonifikator, Branson <i>Sonifier</i> 450	Branson
Strom/Spannungsquelle Power Pack 300	BioRad
Thermomixer	Eppendorf
Überkopfschüttler, Drehrotor 3025	GFL
Ultrazentrifuge, Centrikon T-1160; Rotor SW40 T1	Kontron Instruments
UV-Durchlichtschirm (312 nm)	Bachofer
UV-Durchlichtschirm (365 nm) UVT 14 1	Herolab
Vortex-Tischgerät MS1-Minishaker	IKA
Wasserbad, Julabo UC	Julabo
Zentrifuge, Eppendorf 5417R (Eppendorf Reaktionsgefäße)	Heraeus Instruments
Zentrifuge, Rotixa/P (Reaktionsgefäße 15 und 50 ml)	Hettich
Zentrifuge, Centrikon T124, Rotor A614 (0,5 l Gefäße)	Kontron Instruments

3.6.2 Verbrauchsmaterialien

Das in dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterial wurde von den Firmen Falcon, Whatman, Nunc, Menzel-Gläser, Biorad, Eppendorf GmbH, Brand, Protean, Schleicher & Schuell, Engelbrecht, Biozym, Sarstedt, Hellma, Greiner, Pall Cooperation sowie Pierce bezogen.

3.7 Tiere

Zur Durchführung von Transformationsversuchen (4.6.2) wurden primäre Rattennierenzellen (BRK) benötigt. Zur Gewinnung der Nieren wurden Sprague-Dawley-Ratten (Charles River, Kißlegg) gehalten.

3.8 Computerprogramme und Datenbanken

Die zur Erstellung der vorliegenden Arbeit genutzten Programme und Datenbanken sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

BEZEICHUNG	BESCHREIBUNG	QUELLE
Acrobat Reader 8.1	Öffnen von PDF-Dateien	Adobe
Bio Edit 7.0.5.2	Sequenzvergleiche	http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html
EndNote 9.0	Verwaltung von Referenzen	Thomson
File Maker Pro 8.0	Datenbanken der Arbeitsgruppe	FileMaker, Inc.
GeneRunner	Sequenzbearbeitung	Hastings Software Inc.
Illustrator CS2	Erstellung von Abbildungen	Adobe
Meta View 4.6	Erstellung digitaler Fluoreszenzbilder	Universal Imaging Corporation
Microsoft Office XP 2002	Erstellung von Texten, Diagrammen und Tabellen	Microsoft
NetGene2	Vorhersage potenzieller Spleißdonor- & Spleißakzeptorstellen	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/
Photoshop 6.0	Bildbearbeitung	Adobe
PubMed	Literatur-Datenbank (National Library of Medicine)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed
Scion Image	Quantifizierung von Proteinbanden	Scion Corporation

4 METHODEN

4.1 Arbeiten mit *E. coli*

4.1.1 Kultivierung und Lagerung

Flüssigkulturen

Zur Anlage von Flüssigkulturen wurde Luria-Bertoni-Medium (LB-Medium) mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 150–220 UpM in einem Inkubationsschüttler inkubiert.

LB-Medium:	Bacto Trypton	10,00 g/l
• pH 7,4 mit NaOH eingestellt	Bacto <i>Yeast Extract</i>	5,00 g/l
• autoklaviert	NaCl	5,00 g/l

Plattenkulturen

Der verwendete Nährboden bestand aus LB-Medium mit 1,5% Bacto Agar (pH 7,4; autoklaviert und bei 4°C gelagert). Die Platten wurden mit Bakterien aus einer Flüssig- oder Glyzerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. So bebrütete Platten sind, mit Parafilm verschlossen, mehrere Wochen bei 4°C lagerbar.

Glyzerinkulturen

Zur längerfristigen Lagerung (über Jahre) von Bakterienkulturen wurden Glyzerinkulturen angelegt. Hierzu wurden 5 ml einer monoklonalen Flüssigkultur kurz vor dem Eintritt in die stationäre Wachstumsphase 10 min bei 3800 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,5 ml LB-Medium aufgenommen und in einem CryoTube™ mit 0,5 ml sterilem Glyzerin versetzt. Anschließend wurde die Kultur stufenweise abgekühlt und bei -80°C gelagert.

Selektion

Sollte auf den Erwerb/Erhalt von Plasmiden selektioniert werden, wurden dem Medium Antibiotika zugesetzt, deren Resistenzgene auf den Plasmiden kodiert sind. Hierzu wurden Ampicillin und Kanamycin in den finalen Konzentrationen

100 µg/ml bzw. 50 µg/ml eingesetzt. Plasmide zur Expression von E1B-55K scheinen in *E. coli* toxisch zu wirken. Um den Selektionsdruck auf Erhalt solcher Plasmide zu erhöhen, wurde statt Ampicillin das stabilere Carbenicillin (50 µg/ml) verwendet. Die Antibiotika-Stammlösungen wurden sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

4.1.2 Transformation von *E. coli*

Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

Die Gewinnung elektrokompetenter *E. coli* erfolgte nach Sharma und Schimke (Sharma und Schimke, 1996). 10 ml einer Übernachtskultur wurden zu 1 l YENB-Medium (*yeast nutrient broth*-Medium) gegeben und bei 37°C mit 150–220 UpM geschüttelt. Hierbei wurde regelmäßig im Spectrophotometer die optische Dichte der Zellsuspension bei 600 nm (OD₆₀₀) ermittelt. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5–0,6 wurde die Kultur für 5 min auf Eis gekühlt und 10 min bei 4°C und 3500 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet zweimal in 100 ml eiskaltem H₂O_{bid.} und einmal in 10% Glyzerin resuspendiert und zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 3 ml 10% Glyzerin aufgenommen und in 50 µl-Aliquots aufgeteilt. Die Suspension wurde schließlich in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

YENB-Medium:

- autoklaviert

Bacto Nutrient Broth	8,00 g/l
Bacto Yeast Extract	7,50 g/l

Transformation durch Elektroporation

Die DNA (1 µg bzw. bei Ligationen der vollständige Ansatz) wurde vor der Transformation durch Ausfällen entsalzt. Dazu wurde diese mit 5 µg Lachssperma-DNA, 1/10 Volumen (Vol.) 3 M Natriumacetat und 1 Vol. Isopropanol versetzt und 10 min bei Raumtemperatur und 18000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 75% EtOH gewaschen, an der Luft getrocknet und in 10 µl H₂O_{bid.} resuspendiert.

Die DNA wurde in sterilem 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 aufgenommen. Ein 50 µl-Aliquot elektrokompetenter Bakterien wurde auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden die Bakterien mit 5 µl (1–10 µg) DNA zusammen in eine vorgekühlte

Elektroporationsküvette (1 mm Elektrodenabstand) gegeben. Die Elektroporation wurde durch einen Stromstoß in einer MicroPulser™ Elektroporationsapparatur (Spannung 1,25 kV; Kapazität 25 µF; Parallelwiderstand 200 Ω) durchgeführt. Sofort nach dem Impuls wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium (4.1.1) überführt und 45 min bei 37°C geschüttelt. Die Kultur wurde zentrifugiert, in 50 µl Überstand resuspendiert und auf LB-Nährböden (4.1.1) mit geeigneten Antibiotika ausplattiert.

4.1.3 Identifizierung rekombinanter Klone

Plasmide wurden, wie unter 4.1.2 beschrieben, durch Elektroporation in *E. coli* eingebracht. Die transformierten Bakterien wurden anschließend auf LB-Agarplatten (4.1.1) mit geeigneten Antibiotika ausplattiert und für 16–48 h bei 37°C inkubiert. Um einen Klon zu identifizieren, der das gewünschte Plasmid trägt, wurden mehrere Einzelkolonien gewonnen und in je 15 ml LB-Medium (4.1.1) mit geeigneten Antibiotika übertragen. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C mit 200 UpM inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Ansatz geteilt: 5 ml der Kultur wurden genutzt um eine Glyzerinkultur anzulegen (4.1.1), während der Rest zur Gewinnung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse (4.2.1.1) eingesetzt wurde. Die gewonnene DNA wurde in 50 µl sterilem 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 aufgenommen. 5 µl davon wurden zur Kontrolle mit geeigneten Restriktionsenzymen gespalten (4.2.3) und das Restriktionsmuster analysiert (4.2.4). Klone, die ein korrektes Bandenmuster zeigten, wurden ferner durch DNA-Sequenzierung (4.2.7) überprüft. Je ein korrekter Klon wurde in die Datenbank der Arbeitsgruppe aufgenommen und die erzeugte Glyzerinkultur archiviert.

4.2 DNA-Techniken

4.2.1 Isolierung von DNA

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

Für die Präparation kleiner Plasmidmengen zu analytischen Zwecken wurde ein modifiziertes Protokoll der alkalischen Lyse eingesetzt (Beck *et al.*, 1993).

Hierbei werden 10 ml einer Übernachtskultur 1 min bei Raumtemperatur (RT) mit 18000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und das Zellsediment in 300 µl Lösung A resuspendiert. Anschließend wurden 300 µl Lösung B zugegeben und der Ansatz durch vorsichtiges Schwenken homogenisiert. Nach fünfminütiger Lyse bei RT wurden 300 µl Lösung C zugesetzt. Nach erneuter fünfminütiger Inkubation bei RT wurde die Probe zentrifugiert (10 min; 18000 g; RT). Der Überstand wurde in 630 µl Isopropanol überführt und zur Ausfällung der Plasmid-DNA 10 min bei RT und 18000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und das DNA-Pellet vorsichtig mit 1 ml 75% Ethanol überschichtet. Nach Absaugen des Ethanols wurde das Pellet getrocknet und in 50 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 aufgenommen.

Lösung A:	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
• Lagerung bei 4°C	RNAse A	100 µg/ml
	EDTA	10 mM
Lösung B:	NaOH	200 mM
	SDS	1% (w/v)
Lösung C:	NH ₄ OAc	7,5 M
• Lagerung bei 4°C		

Zur Gewinnung von Plasmiden für Sequenzierungen bzw. zur Gewinnung großer Plasmidmengen wurden Qiagen *Plasmid Kits* (4.5.2) verwendet. Dabei wurden 5–10 ml (*Mini*) bzw. 500–1000 ml (*Maxi*) einer Übernachtskultur nach Herstellerangaben aufgearbeitet und in 50–200 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 aufgenommen.

4.2.1.2 Präparation genomischer DNA aus Säugerzellen

Um die chromosomale Integration transfizierter DNA in Säugerzellen durch PCR (4.2.8) nachweisen zu können, wurde die genomische DNA der Zellen isoliert.

Die Zellen einer konfluent bewachsenen 100 mm-Schale wurden wie unter 4.4.1 beschrieben trypsiniert und in PBS aufgenommen. Anschließend wurde die Zellkonzentration bestimmt (4.4.2). 1×10^6 Zellen wurden entnommen und erneut

pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 200 µl Extraktionspuffer mit Proteinase K und RNase A aufgenommen und resuspendiert. Zur Lyse wurde der Ansatz 1 h bei RT im Überkopfschüttler inkubiert und anschließend sonifiziert (Branson *Sonifier* 450; Stufe 8, 80%, 2x15 s). Um die genomische DNA von Verunreinigungen zu befreien wurde eine Phenol-Extraktion durchgeführt. Hierbei wurde der Ansatz in ein *Phase lock Gel*-Röhrchen überführt und mit 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt (Überkopfschüttler; 5 min; RT). Danach wurde 5 min bei 16000 g zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch einmal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) sowie zweimal mit Chloroform durchgeführt. Anschließend wurde die wässrige Phase mit 0,7 Vol. Isopropanol und 0,07 Vol. 3 M Natriumacetat, pH 4,8 vermischt und zur Ausfällung der DNA 30 min bei RT und 18000 g zentrifugiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde vorsichtig mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach Absaugen des Ethanols wurde das Pellet getrocknet und in 50 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 aufgenommen.

Extraktionspuffer:	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	50 mM
	SDS	0,1% (w/v)
	Proteinase K (immer frisch zusetzen)	0,1 g/l
	RNase A (immer frisch zusetzen)	0,1 g/l

4.2.1.3 Präparation adenoviraler DNA aus Virus

Um die rekombinanten Adenoviren auf mögliche Fehler zu überprüfen, wurde ihr Genom gereinigt und durch geeignete Restriktion (4.2.3) sowie Sequenzierung (4.2.7) untersucht. Hierzu wurden mit Hilfe des Vivapure® AdenoPack 20 Adenoviren nach Angaben des Herstellers isoliert, gereinigt und auf ca. 1 ml Lösung konzentriert. Der gewonnene Virusstock wurde anschließend mit 200 µg/ml Proteinase K, 0,5% SDS sowie 6 µl RNase T1 versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die virale DNA wurde anschließend wie unter 4.2.1.2 beschrieben mit *Phase Lock Gel*-Röhrchen isoliert.

4.2.2 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Konzentration und Reinheit von DNA- und RNA-Proben lassen sich spektrometrisch ermitteln. Hierbei wird die UV-Absorption im Wellenlängenbereich zwischen 250 und 290 nm in einem Zweistrahl-Absorptionsfotospektrometer mit einer geeigneten Referenz verglichen. Die optische Dichte am Absorptionsmaximum bei 260 nm (OD_{260}) wurde ermittelt und über das Lambert-Beersche Gesetz in die Nukleinsäure-Konzentration umgerechnet. Die Schichtdicke χ der durchstrahlten Probe betrug im verwendeten System 1 cm.

Lambert-Beersches Gesetz	$c = OD_{260}/(\epsilon \cdot \chi)$
--------------------------	--------------------------------------

Der massenbezogene Extinktionskoeffizient ϵ ist abhängig von der Art der Probe:

doppelsträngige DNA	0,020 ml/($\mu\text{g} \cdot \text{cm}$)
einzelsträngige Oligonukleotide	0,030 ml/($\mu\text{g} \cdot \text{cm}$)
einzelsträngige RNA	0,025 ml/($\mu\text{g} \cdot \text{cm}$)

Die Reinheit der DNA wurde durch den Vergleich der Absorptionen bei 260 und 280 nm ermittelt. Eine verstärkte Absorption bei 280 nm zeigt eine Verunreinigung mit Proteinen an. Bei optimaler Reinheit der DNA liegt der Quotient OD_{260}/OD_{280} bei 1,8.

4.2.3 DNA-Restriktionsspaltung

Die Restriktionsendonukleasen wurden entsprechend der vom Hersteller empfohlenen Bedingungen verwendet. Für analytische Zwecke wurde in einem 20 μl -Reaktionsansatz 1 μg DNA mit 3 U Restriktionsendonuklease für eine Stunde gespalten (U: *unit*; Menge an Enzym die in einer Stunde 1 μg Substrat umsetzt).

Für präparative Zwecke wurden 5–10 μg DNA mit 10 U Restriktionsendonuklease in einem 50 μl -Ansatz für mindestens 3 h verdaut. Wurden mehrere Enzyme im selben Ansatz verwendet, so wurde ein Puffer gewählt, in dem alle über eine ausreichende Aktivität verfügten. Enzyme, die aufgrund ihrer Pufferbedingungen oder Arbeits-

temperatur nicht gemeinsam verwendet werden konnten, wurden nacheinander eingesetzt. Zwischen den einzelnen Schritten wurde die DNA gefällt. Hierzu wurden 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 1 Vol. Isopropanol zum Probenvolumen (1 Vol.) gegeben und die DNA anschließend durch Zentrifugation (10 min; 18000 g; RT) gefällt. Der Überstand wurde abgezogen, das DNA-Pellet vorsichtig mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen und in Restriktionspuffer bzw. 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 aufgenommen.

4.2.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

DNA bewegt sich aufgrund ihrer gleichmäßigen negativen Ladung in einem elektrischen Feld in Anodenrichtung. In einem Agarosegel werden größere DNA-Fragmente stärker behindert als kleinere und wandern deshalb langsamer.

In Abhängigkeit von der Aufgabenstellung wurden Gele mit 0,8–1,5% (w/v) Agarose in TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer) verwendet. Zur Herstellung eines Gels wurde die Agarose durch Aufkochen (Mikrowelle) in 1x TBE gelöst. Anschließend wurden 50 ng Ethidiumbromid pro ml Lösung zugesetzt.

Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Vol. 6x DNA-Auftragspuffer versetzt und zusammen mit einem Größenstandard (1 kb *ladder* oder 100 bp *ladder*) auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 5–10 V pro cm Gellänge.

Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und färbt unter UV-Licht die DNA-Banden an. Analytische Gele wurden auf einem UV-Durchlichtschirm (312 nm Wellenlänge) mit Hilfe eines Gel Print 2000i Geldokumentationssystemes ausgewertet. Die Banden bei präparativen Gelen wurden zur Schonung der DNA mittels langwelligerem und damit energieärmerem UV-Licht (365 nm) detektiert und anschließend mit einem Skalpell ausgeschnitten. Um die Schädigung der DNA durch das UV-Licht weiter zu reduzieren, wurde den präparativen Gelen bei der Bearbeitung von Bacmiden zusätzlich 1 mM Guanosin zugesetzt.

5x TBE:	Tris	42,5 mM
	Borsäure	445 mM
	EDTA	2,35 mM

6x DNA-Auftragspuffer:	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
	Xylencyanol	0,25% (w/v)
	Glyzerin	50% (v/v)
	5x TBE	20% (v/v)

4.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die mittels Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente wurden für weiterführende Arbeiten aus dem Agarosegel ausgeschnitten und anschließend mit dem Qiagen *Gel Extraction Kit* nach Herstellerangaben aufgereinigt. PCR-Produkte wurden ohne vorherige Agarose-Gelelektrophorese mit diesem System aufgereinigt, sofern nur ein DNA-Produkt gebildet wurde.

Für die Isolierung großer Bacmid-DNA-Fragmente wurden ausgeschnittene Gelblöcke 2 h bei RT und 50200 g zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde anschließend gefällt (4.2.1) und in 40 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 aufgenommen.

4.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch Restriktionsenzyme gespaltene DNA-Fragmente können durch Verwendung der T4-DNA-Ligase miteinander verbunden werden, sofern kompatible Enden vorliegen. Bei der Herstellung rekombinanter Bacmide wurde das adenovirale Restgenom vor der Ligation zusätzlich noch mit 5 U thermosensitiver alkalischer Phosphatase behandelt (30 min 37°C; 45 min 65°C), um eine Religation des Vektors zu verhindern.

Durch Restriktionsspaltung gewonnene DNA-Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt (4.2.4) und anschließend aus dem Gel isoliert (4.2.5). Zur Herstellung rekombinanter Plasmide wurden Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:10 gemischt und ligiert. Ein Standardligationsansatz von 20 µl enthielt 100 ng des linearisierten Vektors, 2,5 U T4-DNA-Ligase, 2 µl 10x Ligationspuffer sowie das Insert in entsprechender Konzentration. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 13°C. Die gewonnenen rekombinanten Plasmide konnten anschließend direkt zur Elektroporation in *E. coli* (4.1.2) eingesetzt werden.

4.2.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von der Firma Geneart, Biopark Regensburg durchgeführt. Die Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 8 μl enthielten 200–500 ng DNA, sowie 6 pmol eines sequenzspezifischen Starter-Oligonukleotids (3.2.1).

4.2.8 Polymerase-Kettenreaktion

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*; Saiki, 1988) können ausgewählte DNA-Stränge gezielt überexponentiell vermehrt werden. Die für die Polymerisation verwendeten Oligonukleotide (3.2.1) legen dabei fest, welche DNA-Sequenzen spezifisch vermehrt werden.

Die 50 μl -Standard-PCR-Ansätze setzten sich, soweit im Text nicht anders erwähnt, wie in Abb. 4.1 beschrieben zusammen. Die Komponenten wurden in der angegebenen Reihenfolge in 0,2 ml Reaktionsgefäßen auf Eis zusammengegeben.

50 μl -Standard-PCR-Ansatz		PCR-Protokoll			
		Zyklen	Zeit	Temp.	Funktion
H ₂ O _{bid., steril}	31,6 μl				
10x PCR-Puffer	5,0 μl		90 s	95°C	Denaturierung
dNTP-Mix ¹ [10 mM]	1,0 μl	20-35	30 s	95°C	Denaturierung
Oligonukleotid 1 [10 μM]	5,0 μl		30 s	(T _M - 5)°C ³	Hybridisierung
Oligonukleotid 2 [10 μM]	5,0 μl		60 s/kb ²	72°C	Polymerisation
DNA-Probe <0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	2,0 μl		420 s	72°C	Polymerisation
Taq-DNA-Polymerase [5 U/ μl]	0,4 μl		-	4°C	Lagerung

Abb. 4.1: **Ansatz und Protokoll der durchgeführten PCR-Reaktionen.** ¹: dNTP-Mix enthält je 10 mM dATP, dGTP, dTTP und dCTP; ²: DNA-Syntheserate der Taq-DNA-Polymerase bei 68-72°C; ³: Die gewählte Hybridisierungstemperatur lag immer 5°C unter der mittleren Schmelztemperatur (T_M) der verwendeten Oligonukleotide.

Die Reaktionen wurden in einem *GeneAmpTMPCR System 9700* Thermocycler von Perkin Elmer nach dem in Abb. 4.1 angegebenen Protokoll durchgeführt.

Erfolgte die PCR zu analytischen Zwecken, wurde die Größe des PCR-Produktes elektrophoretisch überprüft (4.2.4). Für weiterführende Analysen wurde das Produkt sequenziert (4.2.7) oder durch Restriktionsenzyme gespalten (4.2.3).

Zur präparativen Gewinnung von PCR-Produkten (u. a. zur Herstellung rekombinanter Plasmide) wurde der Standard-Ansatz vervierfacht (200 µl Gesamtvolumen). Nach der PCR wurde der Ansatz durch Gelelektrophorese gereinigt (4.2.4) und das PCR-Produkt wie unter 4.2.5 beschrieben gewonnen.

4.2.9 Gerichtete Mutagenese

Die gerichtete Einführung von Punktmutationen in rekombinante Plasmide erfolgte mit dem QuikChange™ *Site-Directed Mutagenesis Kit* nach Anweisungen des Herstellers. Hierbei werden zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide (3.2.1) verwendet, die bis auf die einzufügende Mutation, der Sequenz des zugehörigen Plasmidbereichs entsprechen. In der durchgeführten PCR-Reaktion wird die vollständige Plasmidsequenz inklusive der gewünschten Basenaustausche amplifiziert. Die als Vorlage dienenden, methylierten DNA-Stränge können anschließend durch *DpnI* gezielt abgebaut werden.

4.3 RNA-Techniken

4.3.1 Isolierung zytoplasmatischer RNA aus Säugerzellen

Zur Gewinnung von RNA wurden die Zellen einer zu 60–80% konfluent bewachsenen 150 mm-Schale wie unter 4.7.1 beschrieben geerntet. Die Aufreinigung zytoplasmatischer RNA aus den Zellen erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit* nach den Angaben des Herstellers (Qiagen). Die RNA wurde schließlich in 30 µl Elutionspuffer aufgenommen.

4.3.2 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription mit der Superscript II RNase H-Reverse Transkriptase wird RNA in DNA rückübersetzt. Die Methode wurde genutzt, um gezielt mRNA in cDNA (cDNA: *copy DNA*) zu überführen. mRNA unterscheidet sich von anderen RNA-Spezies durch die Poly(A)-Sequenz am 3'-Ende. Daher wurde für die Reaktion Oligo-Desoxythymidin (Oligo(dT)) verwendet. Die Reaktionen wurden

nach Angaben des Herstellers (Gibco BRL) durchgeführt. Anschließend wurden die Proben bei -20°C gelagert.

4.3.3 Isolierung und Klonierung der E1BN-cDNAs

Zur Studie der E1BN-Proteine wurden rekombinante Expressionsplasmide benötigt. Da die Leserahmen von E1B-156R, E1B-93R und E1B-84R durch alternative Spleißprozesse gebildet werden, war eine direkte Amplifikation aus dem Ad5-Genom nicht möglich. Stattdessen wurden A549-Zellen wie unter 4.5.4 beschrieben mit Ad5 infiziert. Das hierbei verwendete Virus (H5dl309) trägt die adenovirale Wildtyp-E1-Region (Jones und Shenk, 1979). 24 h nach Infektion wurde die zytoplasmatische RNA der Zellen isoliert (4.3.1) und die enthaltene mRNA durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben (4.3.2). Nach PCR mit geeigneten Starter-Oligonukleotiden (3.2.1) konnten die kodierenden Sequenzen der E1BN-Proteine isoliert und in den Vektor pcDNA3 kloniert werden.

Um E1B-55K unabhängig von den E1B-156R, E1B-93R und E1B-84R exprimieren zu können, wurde ein weiteres Expressionsplasmid hergestellt. Dafür wurde durch gerichtete Mutagenese (4.2.9) die für die Herstellung der E1BN-Proteine benötigte Spleißdonorstelle SD1 (Abb. 2.5) inaktiviert. Ausgehend von den hier vorgestellten Plasmiden wurden für verschiedene Experimente noch weitere Konstrukte hergestellt (3.2.3).

4.4 Zellkultur-Techniken

4.4.1 Kultivierung und Lagerung

Kultivierung

Die verwendeten Säugerzelllinien wurden in komplettiertem Medium bestehend aus DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) mit 5 oder 10% fötalem Kälberserum (FKS) sowie 1% einer Penicillin/Streptomycin-Lösung kultiviert. Die Zellen wuchsen als Einschichtkulturen bei 37°C und 5% CO_2 in einem CO_2 -Inkubator. Das Kulturmedium der Zellen wurde regelmäßig gegen frisches auf 37°C vorgewärmtes Medium ausgewechselt.

Subkultivierung und Trypsinierung

Die Zellen wurden regelmäßig, spätestens bei Erreichen einer Zelldichte von 80–100% Konfluenz trypsiniert und subkultiviert. Dazu wurde das Medium abgenommen und durch PBS ersetzt. Nach Absaugen des PBS wurden die Zellen 5 min bei RT mit Trypsin/EDTA inkubiert. Durch die Behandlung mit Trypsin lösen sich adhärenente Zellen von der Unterlage ab. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von Medium mit FKS abgestoppt. Die Zellen wurden nun 3 min bei 1300 g zentrifugiert und das Zellpellet in vorgewärmtem Medium resuspendiert. Ein Teil dieser Zellsuspension wurde nun in ein Zellkulturgefäß mit frischem, komplettiertem Medium ausgesät, durch schwenken verteilt und weiterkultiviert (Subkultivierung).

PBS¹:	NaCl	140 mM
• pH 7,0 – 7,7	KCl	3 mM
• autoklaviert	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	4 mM
	K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	1,5 mM

¹: Phosphat-gepufferte Salzlösung (*phosphate buffered saline*)

Lagerung

Zur dauerhaften Lagerung von Säugerzellen wurden diese mit DMSO (Dimethylsulfoxid) bei -80°C eingefroren. Dazu wurden Zellen aus der überexponentiellen Wachstumsphase, wie oben beschrieben, abtrypsiniert und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml FKS mit 10% DMSO resuspendiert und in CryoTubes™ überführt. Anschließend wurden die Zellen mit dem Cryo-Einfriergerät „Mr. Frosty“ bei -80°C langsam eingefroren. Die so gewonnenen Cryokulturen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert.

Um konservierte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie rasch bei 37°C aufgetaut, in frischem, vorgewärmtem Medium aufgenommen und in ein geeignetes Kulturgefäß ausgesät. Nach ca. 12 h wurde das Medium gewechselt, um das DMSO zu entfernen.

4.4.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Ermittlung der Zellzahl in einer Suspension erfolgte durch Auszählen der Zellen in einer Neubauer Zählkammer. Hierzu wurden 20 µl der Suspension mit einer geeigneten Menge PBS (4.4.1) verdünnt. Anschließend wurde 1 Vol. Trypanblau-Lösung zugesetzt und ein Teil der Verdünnung in die Neubauer Zählkammer gegeben. Trypanblau kann nur in abgestorbene Zellen eindringen und diese färben. Es ist daher möglich, unter einem inversen Lichtmikroskop, sowohl die Gesamtzellzahl als auch den Anteil lebender Zellen zu bestimmen. Um die Zellzahl ausreichend genau zu bestimmen, wurden die lebenden Zellen in mindestens zwei der vier (jeweils 16-fach unterteilten) Quadrate der Zählkammer ausgezählt. Die Zellzahl pro ml Zellsuspension N errechnet sich anschließend nach folgender Formel:

$$N = (X / Q) * V * 10^4 \text{ Zellen/ml}$$

N: Zellzahl pro ml Medium

X: Summe gezählter Zellen

Q: Anzahl ausgezählter Quadrate

V: Verdünnungsfaktor zwischen Zellen im Medium und in der Probe

Trypanblau-Lösung:	Trypanblau	0,15% (w/v)
	NaCl	0,85% (w/v)

4.4.3 Transfektion von Säugerzellen

4.4.3.1 Kalziumphosphat-Methode

Die von Graham und Van der Eb beschriebene Methode zur Transfektion adhärenter Säugerzellen nutzt die beobachtete zelluläre Aufnahme von Kalziumphosphat (Graham 1973). Bilden sich in einer DNA-haltigen Lösung schwerlösliche Kalziumphosphat-Kristalle, so wird DNA in diese eingelagert. DNA-haltige Kristalle werden nun an die Zelloberfläche adsorbiert und durch Endozytose aufgenommen.

Hierzu wird eine geeignete Menge Zellen in 6-well-Platten oder in 100 mm-Zellkulturschalen in 3 bzw. 10 ml Medium ausgesät und, wie unter 4.4.1 beschrieben,

über Nacht kultiviert. Am nächsten Morgen wurde bei einer Zelldichte von 40–60% das Medium gewechselt. Nach einer einstündigen Inkubation im Brutschrank erfolgte die Transfektion. Für jede Transfektion im 6-well-Maßstab wurden 10 µg Gesamt-DNA (Plasmide mit Lachssperma-DNA auf 10 µg aufgefüllt) mit 30 µl 2,5 M CaCl₂ (sterilfiltriert) in insgesamt 300 µl aufgenommen (mit sterilem H₂O_{bid.} aufgefüllt). Diese Mischung wurde tropfenweise und unter schwenken (1000 UpM) zu 300 µl vorgelegtem 2x BBS-Puffer (BES-buffered saline; BES: N,N-bis (2-Hydroxyethyl) taurin) in ein Polystyren-Röhrchen pipettiert. In der Lösung bilden sich nun Kalziumphosphat-DNA-Kristalle. Sie wird nach 1 min Inkubation bei RT auf die Zellen aufgetropft. Die Zellen wurden anschließend 48 h bei 37°C im CO₂-Inkubator kultiviert, wobei nach 16 h ein Medienwechsel erfolgte.

Bei Transfektionen für Transformations-Versuche oder *Western Blot*-Analysen wurden 100 mm-Zellkulturschalen verwendet. Die Mengen der beteiligten Lösungen wurde entsprechend angepasst (30 µg Gesamt-DNA + 50 µl CaCl₂ mit H₂O_{bid.} auf 500 µl aufgefüllt; 500 µl 2x BBS).

2x BBS-Puffer:	BES	50 mM
• pH 7,05; mit NaOH eingestellt	NaCl	280 mM
• sterilfiltriert	Na ₂ HPO ₄	1,5 mM

4.4.3.2 Liposomen-Methode

Um reproduzierbar einen möglichst hohen Anteil der Zellen zu transfizieren, wurde Lipofectamin 2000 von Invitrogen verwendet. Dieses positiv geladene kationische Lipid lagert sich spontan zu kleinen Vesikeln oder Liposomen zusammen, welche die negativ geladene DNA umhüllen. Diese Liposomen können mit der Zellmembran fusionieren, woraufhin die DNA ins Zelllumen gelangt.

Die Zellen wurden hierzu so in 6-well-Platten ausgesät, dass sie am darauf folgenden Tag rechtzeitig zur Transfektion einen zu ca. 90% konfluenten Zellrasen bildeten. Etwa 20 min vor der Behandlung wurde das Medium gegen 2 ml DMEM ohne Antibiotika und FKS ausgetauscht. Anschließend wurden die Zellen nach Angaben des Herstellers mit Lipofectamin 2000 transfiziert. 24 h später wurde das Medium gegen frisches DMEM mit FKS und Antibiotika ausgetauscht.

4.4.4 Bestimmung der Zellmorphologie

Um Aussagen über die Morphologie transformierter Zellen treffen zu können, wurden diese in 100 mm-Petrischalen ausgesät und über Nacht kultiviert (4.4.1). Nach 24 h wurde das Medium über den subkonfluent angewachsen Zellen abgezogen und durch vorgewärmtes PBS (4.4.1) ersetzt. Direkt anschließend wurden die Zellen im Phasenkontrast (Inverses Lichtmikroskop Leica DM IL) fotografiert.

4.4.5 Metaphasenchomosomen-Präparation

Im Zuge der zellulären Transformation kommt es häufig zu genomischer Instabilität und dadurch u. a. zu Veränderungen in der Chromosomenzahl (2.2.1.2). Um diese Veränderungen zu erfassen, wurden Metaphasenchromosomen isoliert und die Zahl der Chromosomen pro Zelle ermittelt.

Hierzu wurde das Medium exponentiell wachsender Zellen (60–80% konfluent bewachsene 100 mm-Schale) durch frisches Medium mit 0,1 µg/ml des Mitose-Hemmstoffs Colchizin ersetzt. Nach 3 bis 5 h wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA vom Untergrund abgelöst und pelletiert (4.4.1). Anschließend wurden sie vorsichtig in 10 ml vorgewärmter 75 mM KCl-Lösung aufgenommen und 20 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml einer 4°C kalten Methanol/Eisessig (3:1)-Mischung wurde der Ansatz gemischt und bei RT 7 min bei 100 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet dreimal in 5 ml kaltem Methanol/Eisessig gewaschen. Dazu wurde es vorsichtig resuspendiert, 20 min bei 4°C inkubiert und 5 min bei 240 g zentrifugiert. Schließlich wurde die Probe in 1,5 ml Methanol/Eisessig aufgenommen.

Ein Tropfen der gewonnenen Lösung wurde nun aus ca. 1 m Höhe auf einen vorher mit H₂O_{bid.} benetzten Objektträger aufgetropft. Danach wurde der Objektträger bei 37°C getrocknet, 2 min mit Giemsa-Färbelösung überschichtet und anschließend mit H₂O_{bid.} gespült bis sich kein Farbstoff mehr löste. Schließlich wurde der Objektträger erneut bei 37°C getrocknet. Die Metaphasenchromosomen konnten nun unter dem Mikroskop analysiert werden.

Giemsa-Färbelösung:	KH ₂ PO ₄	24,8 mM
	Na ₂ HPO ₄	31,8 mM
	Giemsa	0,03% (w/v)

4.5 Adenovirus-Techniken

4.5.1 Gewinnung rekombinanter Adenoviren

4.5.1.1 Gewinnung E1-mutierter Bacmide

Adenoviren mit Mutationen in der E1-Region wurden mit Hilfe des in der Gruppe entwickelten Verfahrens generiert (Groitl und Dobner, 2007). Hierbei wird die virale DNA in *E. coli* in Form von Ad5-Bacmide erhalten und amplifiziert. Durch Restriktionsspaltung dieser Bacmide mit den Enzymen *SwaI* und *BstZ17I* (1 µg DNA; je 25 U Enzym; *SwaI* 30°C/20 min; *BstZ17I* 37°C/4 h) kann neben dem Restgenom ein Fragment gewonnen werden, das die gesamte E1-Region sowie den bakteriellen Anteil enthält. Durch Zirkularisation dieses Subfragments erhält man E1-Box-Plasmide, die zur Manipulation der E1-Region verwendet werden können. Diese Konstrukte haben eine Größe von 7,7 kb und können somit im Gegensatz zum vollständigen Bacmid (ca. 36 kb) leicht durch gerichtete Mutagenese (4.2.9) verändert werden (Abb. 4.2).

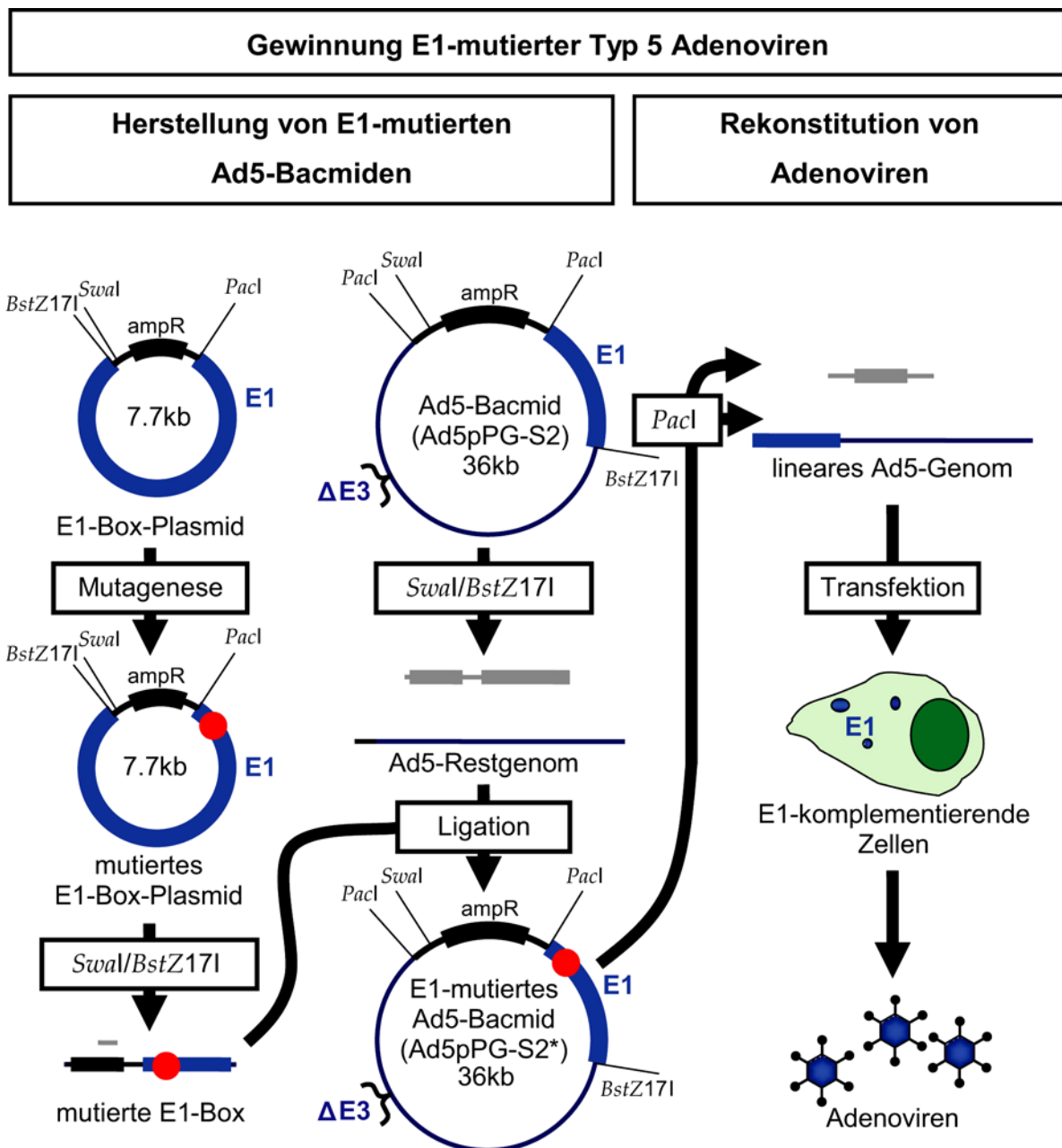


Abb. 4.2: Herstellung E1-mutierter Typ 5-Adenoviren. Die Gewinnung E1-mutierter Viren beginnt mit dem Einbringen der gewünschten Veränderung in ein E1-Box-Plasmid durch gezielte Mutagenese. Die mutierte E1-Box kann nun durch Restriktion mit *SwaI* und *BstZ171* und Ligation auf ein Ad5-Bacmid übertragen werden. Durch Restriktion mit *PacI* wird aus dem Bacmid das lineare Ad5-Genom gewonnen. Nach Transfektion E1-komplementierender Zellen mit diesen Genomen können E1-mutierte Typ 5-Adenoviren gewonnen werden.

Nach Linearisierung mutagenisierter E1-Box-Plasmide mit den Enzymen *BstZ171* und *SwaI* konnten E1-Region und bakterieller Anteil wieder mit dem Restgenom zu einem E1-mutierten Ad5-Bacmid verbunden werden (4.6.2). Abschließend wurden die neuen Bacmide nach Transfektion in *E. coli* XL2-BLUE vermehrt.

4.5.1.2 Rekonstitution von Adenoviren

Zur Rekonstitution von Viren aus Bacmiden wurde der bakterielle Sequenz-Anteil mittels *PacI*-Restriktion (4.2.3) und anschließender Gelelektrophorese (4.2.4) von den viralen Sequenzen abgetrennt (Abb. 4.2). Aus dem Gel wurden lineare virale Genome isoliert (4.2.5), die anschließend mittels der Kalziumphosphat-Transfektion (4.4.3.1) in 911-Zellen eingebracht wurden (jeweils 30 µg DNA / 100 mm-Zellkulturschale). Diese humanen Retinoblastomzellen sind zur Anzucht E1-defekter Adenoviren geeignet, da sie stabil die Ad5 E1-Proteine exprimieren.

Die transfizierten Zellen wurden für 5 Tage weiterkultiviert. Da ca. 90% der produzierten Adenoviren zellassoziiert bleiben (Jakoby und Pastan, 1979), wurden die Zellen zur Gewinnung der Viren geerntet (4.7.1) und aufgeschlossen. Hierzu wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst, bei 750 g für 5 min pelletiert, mit 5 ml PBS (4.4.1) gewaschen und anschließend in 5 ml DMEM aufgenommen. Durch vier Zyklen aus Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C im Wasserbad wurden die Zellen aufgeschlossen und die enthaltenen Viren freigesetzt. Nach Reinigung durch Zentrifugation (10 min; 5000 g) wurde mit dem erhaltenen Virus-Überstand eine weitere 100 mm-Schale mit 911-Zellen infiziert (4.5.4). Dieses Vorgehen wurde so oft wiederholt (in der Regel zwei- bis fünfmal) bis sich die Zellen in weniger als 5 Tagen vollständig abgerundet und vom Untergrund abgelöst hatten. Dieses Verhalten wird durch eine massive Infektion der Kultur mit Adenoviren verursacht und als „zytopathischer Effekt“ bezeichnet. Der aus dieser Zellkulturschale gewonnene Virus-Überstand wurde zur Infektion einer 150 mm-Schale eingesetzt, die zur Herstellung eines hochtitrigen Virusstocks genutzt (4.5.2) wurde. Aus einem Teil der gewonnenen Viren wurden virale Genome isoliert (4.2.1.3) und durch Restriktionsanalyse (4.2.3) mit geeigneten Enzymen sowie durch Sequenzierung (4.2.7) überprüft.

4.5.2 Herstellung und Lagerung hochtitriger Virusstocks

Zur Gewinnung eines hochtitrigen Adenovirusstocks wurde eine 150 mm-Zellkulturschale mit 911-Zellen mit einer *moi* (*multiplicity of infection*) von 5 (sofern der Titer bekannt war) wie unter 4.5.4 beschrieben infiziert. Nach Auftreten des

zytopathischen Effekts - jedoch maximal nach fünf Tagen - wurden die Zellen von der Schale abgelöst und 5 min bei 750 g zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 5 ml PBS (4.4.1) gewaschen, erneut zentrifugiert und in 4 ml DMEM aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen durch vier Zyklen aus Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C im Wasserbad aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (10 min; 5000 g) wurde der Überstand zur Infektion von sieben weiteren 150 mm-Schalen mit 911-Zellen verwendet. Diese wurden anschließend in analoger Weise kultiviert und geerntet. Dabei wurden alle Zellen vereinigt, lysiert und in 5 ml DMEM aufgenommen. Nach Zentrifugation der Lösung, wurde der erhaltene Virus-Überstand mit 87% Glycerin versetzt (steril; finale Konzentration: 10%), aliquotiert und bei -80°C gelagert.

4.5.3 Bestimmung von Virustitern

Der Titer eines Virusstocks entspricht der Menge infektiöser Viruspartikel pro Volumeneinheit Lösung. Der Nachweis infektiöser Partikel erfolgte in dieser Arbeit durch die Detektion infizierter Zellen. Hierzu wurde das frühe adenovirale E2A-72K Protein mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Entsprechend werden Titer in fluoreszenzbildenden Einheiten (*fluorescence forming units*; ffu) pro μl Virusstock angegeben.

Zur Titerbestimmung wurden in die sechs Vertiefungen einer 6-well-Platte je 3×10^5 911-Zellen in DMEM mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin ausgesät. 14 bis 16 h später wurden die Zellen mit Verdünnungen des Virusstocks wie unter 4.5.4 beschrieben infiziert. Hierbei wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe des Virusstocks in DMEM (1 bis 10^{-4} μl Virusstock/Vertiefung; sowie eine nicht infizierte Vertiefung als Negativkontrolle) verwendet. 24 h nach Infektion wurden die Zellen geerntet und mit Methanol fixiert (4.7.7).

Das in infizierten Zellen enthaltene Ad5 E2A-72K wurde nun immunhistologisch angefärbt. Hierzu wurden die Zellen zweimal 5 min mit 2 ml TBS-BG gewaschen und anschließend 3 h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit 1 ml des E2A-72K-spezifischen Antikörpers B6-8 behandelt (1:10 in TBS-BG verdünnt). Danach wurde erneut dreimal mit TBS-BG gewaschen und für 3 h bei RT oder über Nacht bei 4°C,

mit 1 ml des Fluoreszenz-markierten Antikörper Alexa™ 488 Anti-Maus (1:1000 in TBS-BG verdünnt) lichtgeschützt inkubiert. Abschließend wurden die Zellen noch dreimal mit TBS-BG gewaschen und mit 1 ml TBS-BG überschichtet. So vorbereitet konnten die Zellen bei 4°C im Dunklen bis zu 48 h ohne signifikanten Signalverlust gelagert werden.

Die Detektion infizierter Zellen erfolgte fluoreszenzmikroskopisch bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Hierbei wurde die Anzahl leuchtender Zellen pro Gesichtsfeld bestimmt. Zur statistischen Absicherung wurden insgesamt 18 Gesichtsfelder ausgezählt, wobei verschiedene Verdünnungsstufen und Objektivvergrößerungen verwendet wurden. Unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe und der Größe des Gesichtsfeldes wurde die Anzahl infizierter Zellen pro μl eingesetzten Virusstocks ermittelt. Da nur Verdünnungen ausgezählt wurden in denen deutlich weniger als 50% der Zellen gefärbt waren, sollte der Anteil mehrfach infizierter Zellen vernachlässigbar sein. Daher lässt sich der erhaltene Wert mit der Anzahl infektiöser Partikel/ μl gleichsetzen. Zur statistischen Absicherung der gemachten Verdünnungsreihen wurden die Titerbestimmungen in Triplikaten durchgeführt.

TBS-BG¹:	Tris/HCl, pH 7,6	20 mM
• autoklaviert	NaCl	137 mM
	KCl	3 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
	Tween 20	0,05 % (v/v)
	NaN ₃	0,05 % (w/v)
	Glyzin	5 g/l
	BSA ²	5 g/l

¹: Tris-gepufferte Salzlösung (*tris buffered saline*) mit BSA und Glyzin

²: Rinderserumalbumin (*bovine serum albumine*)

4.5.4 Infektion mit Adenoviren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene humane Zellen mit Adenoviren infiziert. Die Zellen wurden dabei so ausgesät, dass sie am nächsten Tag zu 60-80% konfluent vorlagen und effizient infiziert werden konnten. Zur Infektion von Zellen wurde Virus in definiertem Verhältnis zur Anzahl der vorhandenen Zellen

eingesetzt. Üblicherweise wurden 1 bis 50 ffu/Zelle verwendet (*multiplicity of infection; moi* 1-50).

Hierzu wurde das Medium von den Zellen abgenommen und diese einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die gewünschte Menge Virus in einem geeigneten Volumen DMEM ohne weitere Zusätze aufgenommen und zu den Zellen gegeben (150 mm-Schale: 9 ml; 100 mm-Schale: 4 ml; 6-*well*-Vertiefung: 1 ml). Die Zellen wurden nun für 1,5 h im Brutschrank inkubiert und dabei alle 15 min vorsichtig geschwenkt. Danach wurde die Infektionslösung abgezogen und durch frisches DMEM mit 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin ersetzt (150 mm-Schale: 25 ml; 100 mm-Schale: 10 ml; 6-*well*-Vertiefung: 3 ml). Die Zellen wurden dem jeweiligen Versuch entsprechend weiterkultiviert.

4.5.5 Ermittlung der Anzahl infektiöser Nachkommenviren

Um zu ermitteln, ob eine Mutation im viralen Genom die Replikationsfähigkeit der Viren beeinflusst, wurde die Anzahl infektiöser Nachkommenviren ermittelt, die nach Infektion von A549-Zellen gebildet werden.

Hierzu wurden pro Ansatz in 3 Vertiefungen einer 6-*well*-Platte je 3×10^5 A549-Zellen ausgesät. Die Zellen wurden am nächsten Tag mit einer *moi* von 10 infiziert (4.5.4) und nach 24, 48 und 72 h geerntet und aufgeschlossen (4.5.2). Die Zahl der gebildeten infektiösen Partikel wurde anschließend durch Titration bestimmt (4.5.3).

4.6 Zelltransformation durch Adenovirus Typ 5-DNA

4.6.1 Gewinnung und Kultivierung primärer Rattennierenzellen

Rattennieren wurden vom Tierstall der Universität Regensburg zur Verfügung gestellt. Dort wurden die *Sprague-Dawley*-Ratten gehalten und die Nieren von 4-6 Tage alten Tieren unter semisterilen Bedingungen entnommen.

Die erhaltenen Nieren wurden zuerst mit zwei sterilen Skalpellens mechanisch zerkleinert. Anschließend wurden die Nieren in sterilem PBS (1 ml pro Niere) mit 0,5 mg/ml Kollagenase/Dispase aufgenommen und für 1,5-2 h im Brutschrank bei 37°C aufgeschlossen. Der Ansatz wurde dabei alle 30 min aufgeschüttelt. Die

erhaltene Zellsuspension (BRK-Zellen) wurde zentrifugiert (5 min; 750 g; 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet dreimal mit je 20 ml sterilem PBS gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in DMEM aufgenommen und auf 150 mm-Schalen mit DMEM (mit 10% FKS sowie 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung) verteilt. Hierbei wurden jeweils die Zellen aus zwei aufgeschlossenen Nieren auf eine 150-mm Schale ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und die primären BRK-Zellen wie beschrieben (4.4.1) bis zur Durchführung eines Transformations-Versuchs ein bis zwei Tage weiterkultiviert (4.6.2).

4.6.2 Transformation primärer Zellen

Um zu untersuchen ob adenovirale Proteine transformierendes, transformationsförderndes oder transformationshemmendes Potenzial besitzen, wurden pro Ansatz 3×10^6 primäre BRK-Zellen (4.6.1) in 100 mm-Schalen ausgesät und wie in 4.4.1 beschrieben kultiviert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen mit der Kalziumphosphat-Methode (4.4.3.1) transfiziert. Hierbei wurden verschiedene Plasmide verwendet, die unterschiedliche Proteine der E1-Region kodieren. Die transfizierten Zellen wurden drei Tage inkubiert, anschließend abtrypsinisiert (4.4.1) und auf jeweils drei neuen 100 mm-Schalen ausgesät. Die Zellen wurden 3–4 Wochen weiterkultiviert, wobei alle vier Tage das Medium gewechselt wurde. Während dieser Zeit wurden nicht-transformierte Zellen seneszent und starben ab, während Zellen, die durch die Expression adenoviraler Gene transformiert wurden, zu mehrschichtigen Zellkolonien (*Foci*) auswuchsen. Diese *Foci* wurden entweder zu Zelllinien expandiert (4.6.3) oder mit Kristallviolett-Lösung angefärbt. Hierzu wurde das Medium von den Schalen abgezogen und durch Kristallviolett-Lösung ersetzt. Nach 10 min Inkubation zur Färbung und Fixierung der Zellen wurde der überschüssige Farbstoff mit Wasser abgespült. Durch Auszählen der gefärbten *Foci* kann der Einfluss unterschiedlicher Adenovirusproteine auf die Transformationsrate ermittelt werden.

Kristallviolett-Lösung:	Kristallviolett	1,0 g/l
	Methanol	25% (v/v)

4.6.3 Etablierung transformierter Zelllinien

Aus einigen der in den Transformations-Versuchen entstandenen Zellkolonien (*Foci*), wurden im Rahmen dieser Arbeit Zelllinien etabliert. Hierbei wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Zur Gewinnung einer polyklonalen Zelllinie wurde die komplette Schale im Anschluss mit Trypsin/EDTA behandelt (4.4.1) und so alle auf einer Schale befindlichen Klone vereinigt. Die Zellen wurden anschließend auf eine 100 mm-Schale mit komplettiertem Medium ausgesät (4.4.1) und im Verlauf mehrerer Wochen zu polyklonalen Zelllinien expandiert.

Um monoklonale Zelllinien zu gewinnen, wurden einzelne Zellklone isoliert trypsiniert. Hierfür wurden Glasringe (5 mm Durchmesser) auf die zu isolierenden *Foci* aufgesetzt. Zum Abdichten wurde sterile Vaseline verwendet. Die Zellen innerhalb der Ringe wurde dann mittels 50 µl Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäße mit 100 µl FKS überführt. Nach anschließender Zentrifugation (3 min; 750 g; RT) wurden die Zellen in 12-Well-Platten ausgesät und in DMEM mit 10% FKS sowie 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert (4.4.1). Die Zellen wurden anschließend über einen Zeitraum von mehreren Wochen expandiert und als monoklonale Zelllinien etabliert.

4.7 Protein-Techniken

4.7.1 Zellernte

Zur Untersuchung zellulärer und viraler Proteine sowie RNAs wurden verschiedene transformierte, transfizierte und infizierte Säugerzellen aufgearbeitet. Transfizierte Zellen wurden - soweit nicht anders angegeben - 48 h nach Transfektion geerntet. Eine Ausnahme bilden hier Experimente in denen p53-exprimierende Plasmide verwendet wurden. Um Veränderungen durch p53-induzierte Apoptose zu vermeiden, wurden diese Ansätze bereits 24 h nach Transfektion geerntet. Infizierte Zellen wurden nach 24 h aufgearbeitet, sofern sie nicht über mehrere Zeitpunkte hinweg zur Dokumentation eines Infektionsverlaufes verwendet wurden. Die entsprechenden Zellen wurden durch Abschaben mit einem sterilen Zellschaber abgelöst, in ein geeignetes Reaktionsgefäß überführt und zusammen mit dem

Medium bei 4°C und 750 g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Nach Abziehen des Überstandes wurde das Zellpellet auf Eis gelagert und zügig weiter verarbeitet.

4.7.2 Zellaufschluß

4.7.2.1 Gewinnung von Gesamtzellextrakten

Zur Durchführung von Immunpräzipitationen und *Western Blot*-Analysen wurden aus den geernteten Zellen (4.7.1) Zellysate gewonnen. Wenn nicht anders angegeben, wurde im Verlauf dieser Aufarbeitung immer auf Eis gearbeitet. Die Zellen wurden in einer geeigneten Menge (ca. 250 µl Puffer pro 1×10^7 Zellen) Lyse-Puffer (4.7.5) durch rütteln resuspendiert und 30 min auf Eis lysiert. Um eine möglichst vollständige Zellyse zu gewährleisten, wurden die Proben anschließend für 30 s sonifiziert (Branson *Sonifier* 450; Stufe 8; 80%; 2x 15 s). Anschließend wurden verbleibende Zellfragmente durch Zentrifugation (10 min; 4°C; 3800 g) sedimentiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

4.7.2.2 Zellaufschluß für Immunpräzipitation mit BD-Nativ

Zur Durchführung von Immunpräzipitationen mit dem niederstringenten Lyse-puffer BD-Nativ wurde ein alternatives Lyseprotokoll verwendet. Hierbei wurde zuerst das Medium über den Zellen mit PBS ersetzt. Nach Abziehen des PBS wurden die Zellen in einem geeigneten Volumen BD-Nativ für 30 min bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen mit einem sterilen Zellschaber abgelöst und durch fünfmaliges Auf- und Abziehen durch eine 27 ½ Gauge Nadel lysiert. Die gewonnene Lösung wurde zur Abtrennung von Zelltrümmern und Aggregaten zweimal für 12 min bei 20000 g zentrifugiert. Das so gereinigte Lysat wurde anschließend in Immunpräzipitationen (4.7.5) eingesetzt.

BD-Nativ:	Tris/HCl, pH 7,4	10 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	1 mM
	EGTA	1 mM
	Triton X-100	1% (v/v)
	Nonidet P-40	0,15% (v/v)
	DTT (immer frisch zusetzen)	1 mM
	PMSF (immer frisch zusetzen)	1 mM

4.7.2.3 Gewinnung zytoplasmatischer Proteine

Die Isolierung des Zytoplasmas von Säugerzellen erfolgte mit einem vereinfachten Protokoll des fraktionierten Zellaufschlusses nach Dignam (Dignam *et al.*, 1983).

Hierzu wurden Zellen wie in 4.7.1 beschrieben geerntet. Anschließend wurden sie in einer dem Volumen des Zellpellets entsprechenden Menge Dignam-Puffer A aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurde anschließend durch fünfmaliges auf und abziehen der Suspension durch eine Spritze mit 27 ½ Gauge Nadel aufgeschlossen. Anschließend wurden Zellkerne und Zelltrümmer für 30 s bei 4°C und 12000 g zentrifugiert. Der Überstand entspricht der Zytoplasma-Fraktion.

Dignam-Puffer A:	Hepes ¹ /HCl, pH 7.9	10 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
	KCl	10 mM
	DTT (immer frisch zusetzen)	1 mM
	PMSF (immer frisch zusetzen)	1 mM

¹: 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure

4.7.3 Bestimmung der Gesamteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten erfolgte mit dem *Protein-Assay* (BioRad), der auf dem von Bradford entwickelten Quantifizierungsverfahren beruht (Bradford, 1976). Hierbei wird ein Färbereagenz verwendet, dessen Absorption bei 595 nm durch die Bindung von Proteinen verstärkt wird. Diese Zunahme ist im Messbereich proportional zur Proteinkonzentration.

Zur Messung wurden Aliquots der Zelllysate in Polystyrol-Küvetten mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 800 µl aufgefüllt. Anschließend wurde jeweils 200 µl Färbe-

reagenz zugegeben und gemischt. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde die Absorptionen bei 595 nm gegen den Nullwert (Ansatz ohne Protein) gemessen. Aus den Messwerten konnten, durch Vergleich mit einer Eichkurve, die Proteinkonzentrationen abgeleitet werden. Zur Erstellung der Eichkurve wurde die Absorption von Proben mit bekannten Protein-Konzentrationen (1–10 µg BSA; *bovine serum albumin*, Rinderserumalbumin) bestimmt.

4.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erlaubt die Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in einem diskontinuierlichen Elektrophorese-System (Laemmli, 1970). Das in Gel, Proben und Laufpuffer enthaltene SDS lagert sich an Proteine an, denaturiert sie und löst so ihre spezifische dreidimensionale Struktur auf. Darüber hinaus werden die Proteine durch das SDS negativ geladen, so dass alle Proteine nahezu denselben Quotienten aus Ladungen pro Proteinmasse aufweisen. Dadurch wird ihre Migrationsgeschwindigkeit im Gel weitgehend unabhängig von Faltung und individueller Eigenladung und ist nur durch die Proteinmasse bestimmt.

Die verwendeten Gele sind aus einem höherprozentigen Trenngel (8–15% Polyacrylamid) und einem darüber liegenden niederprozentigen (5% Polyacrylamid) Sammelgel aufgebaut (Harlow und Lane, 1988). Am Übergang zwischen beiden Gelen werden die Proteine durch einen pH-Sprung (pH 6,8 zu pH 8,8) zu einer scharfen Bande fokussiert. Die Auftrennung der Proteine nach ihren Molekulargewichten erfolgt anschließend im Trenngel. Die Gele wurden nach Angaben des Herstellers in die Gelapparaturen eingesetzt und diese anschließend mit TGS als Laufpuffer befüllt.

Die Proben wurden zur Denaturierung 1:1 mit 2x SDS-Probenpuffer (Sambrook *et al.*, 1989) versetzt und für 3–5 min bei 95°C inkubiert. Sollte E1B-55K nachgewiesen werden, wurde allerdings 12 min bei 55°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben zusammen mit 3 µl Molekulargewichtsstandard (*Precision Protein Standard*) aufs Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur mit 20–30 mA

bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte. Die aufgetrennten Proteine wurden im Folgenden durch *Western Blot*-Analysen (4.7.6) detektiert.

SDS-Gel	Trenngel, pH 8,8				Sammelgel, pH 6,8
	8%	10%	12%	15%	5%
Trennbereich	>75 kDa	75 - 35 kDa	35-15 kDa	<15 kDa	
Bis-/Acrylamid	27% (v/v)	34% (v/v)	41% (v/v)	51% (v/v)	17% (v/v)
Tris/HCl	250 mM (pH 8,8)				120 mM (pH 6,8)
SDS	0,1% (w/v)				0,1% (w/v)

Die Polymerisation wurde durch folgende Mengen Ammonium peroxydisulfat (APS) und N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) gestartet:

10% APS	1% (v/v)				1% (v/v)
TEMED	0,06% (v/v)	0,04% (v/v)	0,04% (v/v)	0,04% (v/v)	0,1% (v/v)

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

TGS:	Tris	25 mM
	Glyzin	200 mM
	SDS	0,1% (w/v)

4.7.5 Immunpräzipitation

Zum Nachweis von Protein/Protein-Interaktionen wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. Diese Methode beruht auf einer spezifischen, Antikörper-vermittelten Bindung eines Proteins an eine zentrifugierbare Sepharose-Matrix. So können dieses Protein und seine Interaktionspartner durch Zentrifugation angereichert und von nicht bindenden Proteinen gereinigt werden. Ein Nachweis der isolierten Proteine erfolgte anschließend im *Western Blot* (4.7.6). Wichtig für den spezifischen Nachweis solcher Interaktionen ist das chaotrope/denaturierende Potenzial (Stringenz) des verwendeten Lysepuffers. Während in hochstringenten Puffern nur sehr starke Interaktionen nachgewiesen werden können, sind in niederstringenten auch schwächere Wechselwirkungen detektierbar.

Abhängig von der Spezies, aus der der verwendete spezifische Antikörper stammt, wurde eine Protein A- (Maus oder Kaninchen) bzw. eine Protein G- (Ratte) gekoppelte Sepharose-Matrix verwendet. Sowohl Protein A als auch Protein G können den Fc-Teil geeigneter Antikörper binden. Zur Detektion Flag-markierter Proteine wurde, wenn angegeben auch Flag (M2)-Sepharose verwendet, bei der der spezifische Antikörper direkt an die Matrix gekoppelt ist.

Für zehn Ansätze wurden zwei Aliquots je 30 mg lyophilisierte Sepharose in je 1 ml geeignetem Lysepuffer (RIPA, RIPA-Light, BD-Nativ oder NP-40) 2 h bei 4°C in einem Überkopfschüttler äquilibriert. Die Suspensionen wurden daraufhin 5 min bei 4°C und 3800 g zentrifugiert und in Lysepuffer gewaschen. Ein Aliquot wurde in 1 ml Antikörper-haltigem Lysepuffer aufgenommen. Hierbei wurden verdünnte Hybridom-Überstände oder 10–20 µg gereinigter Antikörper eingesetzt. Zur Kopplung der Antikörper wurde nun für 2 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Matrix wurde daraufhin erneut zentrifugiert, gewaschen und in 1 ml Lysepuffer resuspendiert.

Währenddessen wurde das zweite Aliquot äquilibrierter Sepharose auf 2 ml-Reaktionsgefäße verteilt (je 3 mg Matrix), mit Zellysat versetzt und mit Lysepuffer auf 1 ml aufgefüllt. Nach 1 h Inkubation auf einem Überkopfschüttler bei 4°C und anschließender Zentrifugation wurden die Lysate zu je 3 mg der Antikörper-gekoppelten Matrix gegeben und 1,5 h bis über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert.

Danach wurden die Ansätze pelletiert und dreimal mit je 1 ml kaltem Lysepuffer gewaschen. Abschließend wurden die Proben in 25 µl 2x SDS-Probenpuffer (4.7.4) aufgenommen, für 3 min bei 95°C denaturiert und im *Western Blot* eingesetzt.

RIPA¹: (hohe Stringenz)	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	Nonidet P-40	1% (v/v)
	SDS	0,1% (w/v)
	Natriumdesoxycholat	0,5% (w/v)
	DTT (immer frisch zusetzen)	1 mM
	PMSF (immer frisch zusetzen)	1 mM

¹: radio immuno precipitation assay

RIPA-Light: (mittlere Stringenz)	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	Nonidet P-40	1% (v/v)
	SDS	0,1% (w/v)
	Triton X-100	0,1% (v/v)
	DTT (immer frisch zusetzen)	1 mM
	PMSF (immer frisch zusetzen)	1 mM
NP-40: (niedrige Stringenz)	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	Nonidet P-40	0,15% (v/v)
	PMSF (immer frisch zusetzen)	1 mM

4.7.6 Western Blot-Analyse

Proteintransfer auf Nitrozellulose

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden *Western Blot*-Analysen durchgeführt. Hierbei wurden die Proteine nach Auftrennung über SDS-PAGE (4.7.4) auf eine Nitrozellulose-Membran mit 0,45 µm Porenweite übertragen. Der Transfer erfolgte in einer *Blot*-Apparatur (Trans-Blot[®] *Electrophoretic Transfer Cell*) durch Anlegen eines elektrischen Feldes (90 min bei 400 mA) nach Anleitung des Herstellers in Towbin-Puffer. Die auf der Membran immobilisierten Proteine konnten anschließend durch Inkubation in Ponceau S-Lösung reversibel angefärbt werden. Zur Entfärbung wurde deionisiertes Wasser verwendet.

Bindung der Immunglobuline

Zur Detektion müssen die Zielproteine mit einem antigenspezifischen, primären Antikörper markiert werden, der wiederum von einem HRP (*horseradish peroxidase*; Meerrettich-Peroxidase)-gekoppelten, sekundären Antikörper gebunden wird.

Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde die Membran mit 5% Magermilchpulver in PBS (1 h; RT oder über Nacht; 4°C) inkubiert. Anschließend wurde sie einmal für 5 min mit PBS-Tween gewaschen und in einer Verdünnung des spezifischen Antikörpers in PBS-Tween mit 1% (w/v) Magermilchpulver für 1 h bei RT geschwenkt. Nach der Bindung des primären Antikörpers wurde die Membran

erneut dreimal 5 min in PBS-Tween gewaschen und für 1 h mit einer 1:5000 Verdünnung des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden nun durch erneutes dreimaliges Waschen in PBS-Tween entfernt.

Detektion über Enzym-Substrat vermittelte Leuchtreaktion

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte durch verstärkte Chemilumineszenz. Hierbei wird zyklisches Diacylhydrazid-Luminol von der gebundenen Meerrettich-Peroxidase unter Lichtemission bei 428 nm Wellenlänge oxidiert. Die Leuchtreaktion wurde durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert.

Nach Abgießen der letzten Waschlösung wurde eine 1:1 Mischung der beiden Lösungen des Chemilumineszenz-Substrates (Super Signal® West Pico *Chemiluminescent Substrate*) in einer Menge von etwa 0,125 ml/cm² auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Nach 5 min Inkubation wurde das Substrat abgenommen, die Membran in Folie eingeschlagen und in eine Filmkassette geklebt.

In einer Dunkelkammer wurde zur Signal-Detektion ein Röntgenfilm aufgelegt und nach einer geeigneten Belichtungszeit (2 s bis 2 h) entwickelt. Hierzu wurde der Film nacheinander in Entwicklerlösung (3 min), H₂O_{bid.} (1 min), Fixiererlösung (3 min) und wieder in H₂O_{bid.} (5 min) inkubiert. Entwickelte Filme wurden nach dem Trocknen zur Dokumentation eingescannt.

Towbin-Puffer:	Tris/HCl, pH 8,3	25 mM
	Glyzin [g]	200 mM
	SDS	0,05% (w/v)
	Methanol	20%
Ponceau S:	Ponceau S	0,1% (w/v)
	Eisessig, p. a.	5% (v/v)
PBS-Tween:	Tween-20	0,05% (v/v)
	in PBS (4.4.1)	

4.7.7 Immunfluoreszenz-Analysen

Durch Immunfluoreszenz-Analysen kann die Lokalisation von Proteinen in der Zelle visualisiert werden. Dabei werden die Proteine von einem spezifischen primären Antikörper erkannt und mit Hilfe eines sekundären, Fluoreszenz-markierten Antikörpers, der an den Fc-Teil des primären Antikörpers bindet, sichtbar gemacht. Adhärente Zellen wurden in 6-well-Platten auf sterilen Deckgläsern oder in 100 mm-Schalen auf sterilen Objektträgern ausgesät und über Nacht kultiviert (4.4.1). Gegebenenfalls wurden die Zellen entsprechend des experimentellen Aufbaus anschließend transfiziert (4.4.3) oder infiziert (4.5.4) und weitere 24-48 h kultiviert. Vor der Immunmarkierung der Zielproteine mussten die Zellen auf dem Träger fixiert werden. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit PBS (4.4.1) gewaschen und anschließend mit Methanol oder Paraformaldehyd fixiert.

Methanol-Fixierung

Hierzu wurden die Zellen für 15 min bei -20°C mit vorgekühltem Methanol überschichtet. Anschließend wurde das Methanol abgezogen und die fixierten Zellen bei RT getrocknet. So präpariert konnten die Zellen entweder sofort weiterverarbeitet oder mehrere Wochen bei -20°C gelagert werden.

Paraformaldehyd-Fixierung

Alternativ wurden die Zellen mit 2% Paraformaldehyd (PFA) in PBS für 10 min bei RT vorfixiert und anschließend für 10 min mit 0,5% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Abschließend erfolgte ein zehnminütiger Fixierungsschritt mit 4% PFA in PBS. In PBS können PFA-fixierte Zellen für eine Woche bei 4°C gelagert werden.

Immunfärbung

Die fixierten Zellen wurden zweimal mit PBS und einmal mit PBS-Tween (4.7.6) für jeweils 5 min gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurden die Zellen anschließend für 1 h in TBS-BG (4.5.3) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (5 min in PBS) wurden die Zellen für 1 h mit 40 µl einer Verdünnung des primären Antikörpers in PBS bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Wurden Objektträger verwendet, so wurden mit einem Glaskratzer 2-3 kreisförmige Bereiche markiert und

die außerhalb liegenden Zellen entfernt. Diese Behandlung verhindert das Verlaufen der Antikörperverdünnung, da diese nun durch die Oberflächenspannung in den Kreisen gehalten wird. Nach einem weiteren dreifachen Waschschrift wurden die Zellen mit 40 µl einer 1:100 Verdünnung des Fluoreszenz-gekoppelten sekundären Antikörper sowie 0,5 µg/ml DAPI (4',6-Diamidin-2'-Phenylindol Dihydrochlorid) zur Anfärbung des Chromatins überschichtet und für 1 h im Dunklen in einer feuchten Kammer inkubiert. Abschließend wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen, kurz abgetropft und mittels *Glow Mounting Medium* und einem Deckglas bzw. Objektträger versiegelt. Die Proben können im Dunklen bei 4°C bis zu einer Woche gelagert werden.

Um zu überprüfen, ob zwei verschiedene Proteine in der Zelle kolokalisieren wurden die beiden primären und die beiden sekundären Antikörper bei der Färbung gemeinsam eingesetzt. Um eine Zuordnung der Fluoreszenzsignale zu den Zielproteinen zu gewährleisten, müssen die primären Antikörper aus verschiedenen Spezies stammen und die zugehörigen sekundären Antikörper mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert sein.

Auswertung

Die Immunfluoreszenz-Messungen erfolgten mit einem aufrechten Fluoreszenz-Mikroskop Leica DM RX mit digitalem Bildverarbeitungssystem.

4.8 Transkriptions-Reporter-Versuch

Zur Untersuchung der Transkriptionsrepression durch die E1B-Proteine wurde das *Dual-Luciferase® Reporter Assay* System verwendet. Hierbei wird die Beeinflussung der Promotoraktivität eines Reporter-Gens untersucht. Als Reporter-Konstrukte wurden Plasmide mit *Firefly*-Luziferase-Expressionskassetten unter Kontrolle unterschiedlicher Promotoren benutzt. Zur Untersuchung der Repression der p53-abhängigen Genexpression durch E1B-Proteine wurden Konstrukte mit p53-abhängigen Promotern (pRE-LUC und pHH0.34-TK-LUC) in Anwesenheit eines p53-Expressionskonstrukts (pC53-SN3) verwendet. Die Funktion der E1B-Transkriptions-

Repressionsdomäne wurde mittels Gal4-DNA-Bindedomäne-E1B-Fusionsproteinen und einem Reporter mit Gal4-DNA-Bindestellen (pGalTK-Luc) untersucht. Zur Normierung wurde allen Ansätzen das Plasmid pRL-TK zugegeben, das die *Renilla*-Luziferase stabil und konstitutiv exprimiert. Beide Luziferasen können unabhängig voneinander angeregt und vermessen werden. Die Aktivität der Reporterkonstrukte wurde daher relativ zur *Renilla*-Luziferase-Aktivität bestimmt.

Für jeden Ansatz wurden 2×10^5 H1299-Zellen in 6-well-Platten-Vertiefungen ausgesät und 24 h später nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert (4.4.3.1). Hierbei wurden 1 μ g Reporterkonstrukt, 1 μ g *Renilla*-Kontrollplasmid, unterschiedliche Mengen an E1B-Expressionskonstrukten und gegebenenfalls 25 ng pC53-SN3 verwendet. Um Störungen durch Promotor-Kompetition vorzubeugen, wurden alle Ansätze mit geeigneten Vektoren auf gleiche Mengen an CMV- bzw. SV40-Promotor aufgefüllt. Nach 48 h wurden die Zellen mit PBS (4.4.1) gewaschen, mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst, in 1 ml PBS aufgenommen und die Ansätze halbiert. Während eine Hälfte zur Kontrolle der Proteinexpression im *Western Blot* (4.7.6) eingesetzt wurde, wurde die andere in 200 μ l *passive lysis buffer* (Promega) resuspendiert und innerhalb von 15 min unter schwenken bei RT lysiert. Dieses Lysat wurde daraufhin bei RT für 30 s bei 20000 g zentrifugiert und nach Angaben des Herstellers untersucht. Die Lumineszenz-Aktivitäten wurden dabei mit einem Luminometer (Lumat LB 9507, Berthold) bestimmt.

5 ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht die Bedeutung der E1BN-Proteine im Infektionsverlauf anhand geeigneter Virusmutanten aufzuklären. Darüber hinaus wurden die Funktionen von E1B-156R in Transfektionsexperimenten näher untersucht. Besonderes Augenmerk lag hierbei auf einem möglichen Beitrag zur Adenovirus-vermittelten Transformation.

5.1 Herstellung E1B-defizienter Viren

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es aufzuklären, ob die mit E1B-55K verwandten Proteine E1B-156R, E1B-93R und E1B-84R Funktionen in der adenoviralen Infektion wahrnehmen. Da zu Beginn der Arbeit keine geeigneten Konstrukte vorlagen, mussten im ersten Schritt entsprechend veränderte Adenoviren (5.1.1) generiert werden. Da für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen das E1B-19K-Protein nicht von Bedeutung ist, wurde im Folgenden der Begriff „E1B-Proteine“ als Sammelbezeichnung für E1B-55K und die verwandten E1BN-Proteine benutzt.

5.1.1 Design E1B-defizienter Viren

Um die Rolle der E1BN-Proteine in der Infektion beurteilen zu können, sollten Viren mit Defekten in der Expression von einem oder mehreren E1B-Proteinen generiert (Tab. 5.1 & Abb. 5.1) werden. Die einfachste Möglichkeit wäre hierbei die frühzeitige Terminierung einzelner Leserahmen durch das Einbringen von Stopkodons kurz hinter dem Startkodon gewesen. Aufgrund der komplexen Spleißprozesse sowie der gemeinsamen Nutzung des 5'-Bereichs des E1B-55K-Leserahmens durch alle E1BN-Proteine ist dies jedoch nicht möglich. Daher wurde versucht die verwendeten Spleißdonor und -akzeptorstellen zu inaktivieren (Abb. 2.5). War auch dies nicht möglich, wurde durch das Einbringen von Stopkodons in die kodierende Sequenz der Proteine zumindest die Expression der individuellen C-Termini unterbunden (Tab. 5.1 & Abb. 5.1). Bei Herstellung der Virusmutanten wurde darauf geachtet,

dass keine Veränderungen in die Aminosäureabfolge von E1B-19K eingefügt wurden, da der Leserahmen des Proteins teilweise mit dem von E1B-55K überlappt (Abb. 2.5).

Eingeführte Stopkodons

wt	...CGAAGAAACCCATCTGAG...	Pos.
E1B ⁻	... TGA AGAAACCCATCT TAG ...	2025-2042
wt	...TCCAGAACTGAGACGCAT...	Pos.
55K ⁻ & E1B ⁻	...TCC ATA ACT GTG ACGCAT...	2270-2287
wt	...TGCAGCAGCCGCCGCCGC...	Pos.
84RΔC	...TGCAGCAG TGA CCGCCGC...	3590-3607

Mutierte Spleißdonorstelle (SD)

SD-Konsensus	$\begin{matrix} \text{C} & & \text{A} \\ & \text{AGGT} & \text{AGT} \\ \text{A} & & \text{G} \end{matrix}$	
SD1	...CAGGTGGCT...	Pos.
ΔSD	...CA AGT CGCA...	2253-2261

Mutierte Spleißakzeptorstelle (SA)

SA-Konsensus	$\begin{matrix} \text{C} & \text{C} & \text{C} & \text{C} & \text{C} & \text{C} & \text{C} & \text{C} & \text{C} & \text{C} \\ & & & & & & & & & \text{N} \\ & & & & & & & & & \text{AG} \\ & & & & & & & & & \text{G} \\ \text{T} & \text{T} & \text{T} & \text{T} & \text{T} & \text{T} & \text{T} & \text{T} & \text{T} & \text{T} \\ & & & & & & & & & \text{T} \\ & & & & & & & & & \text{A} \end{matrix}$	
SA1	...TTGGGTAACAGGAGG...	Pos.
ΔSA1	...TTGGGTAAC CGG CGG...	3207-3221
SA2	...TATTGCTTGAGC...	Pos.
ΔSA2	...TATTGCTTGA AC ...	3265-3276

Tab. 5.1: Übersicht der eingefügten Mutationen. Dargestellt sind die in den Virusmutanten 55K⁻, E1B⁻, 84RΔC, ΔSD, ΔSA1 und ΔSA2 veränderten Sequenzbereiche. Die zum Einfügen von Stopkodons bzw. zur Inaktivierung von Spleißdonor- und Spleißakzeptorstellen durchgeführten Basenaustausche wurden rot hervorgehoben. Zum Vergleich ist jeweils die Wildtypsequenz (wt) bzw. die intakte Spleißstelle (SD1, SA1 & SA2) gezeigt. Darüber hinaus wurden die Konsensussequenzen eukaryotischer Spleißdonor- (SD-Konsensus) und Spleißakzeptorstellen (SA-Konsensus) angegeben. Essentielle Basen der Spleißstellen sind durch Fett-Druck hervorgehoben. Die Positionen (Pos.) der dargestellten Sequenzbereiche im Ad5 Genom sind jeweils angegeben.

Um E1B-55K unabhängig von E1B-156R, E1B-93R und E1B-84R untersuchen zu können, wurde die Virusmutante H5pm4128 (ΔSD) hergestellt (im Folgenden „ΔSD“ abgekürzt). Hierbei wurde die Spleißdonorstelle SD1 (Tab. 5.1 & Abb. 5.1), die zur Expression aller drei E1BN-Proteine benötigt wird, durch Mutation inaktiviert.

Hierbei wurden drei Basen ausgetauscht; darunter auch ein wichtiges Guanosin an der Exon/Intron-Grenze AG/GT. Die eingebrachten Veränderungen führen dabei zu keinen Aminosäureaustauschen in E1B-55K oder anderen Proteinen. Dieselben Basenaustausche wurden auch zur Generierung des Plasmids pE1B-55K Δ SD verwendet.

Zur gezielten Unterdrückung der Expression von E1B-156R bzw. E1B-93R in den Virusmutanten H5pm4131 (Δ SA2) und H5pm4130 (Δ SA1) wurden die jeweils spezifischen Spleißakzeptorstellen SA2 und SA1 (Tab. 5.1 & Abb. 5.1) inaktiviert. Da die eukaryotische Spleißakzeptor-Konsensussequenz (Tab. 5.1) relativ schwach konserviert ist, ist lediglich das Dinukleotid „AG“ an der Intron/Exon-Grenze fast aller Spleißakzeptoren zu finden und für die meisten Spleißprozesse (>99%) essentiell (Sheth 2006). Daher wurde es in beiden Viren durch Mutation inaktiviert. Da an der Spleißakzeptorstelle SA1 zwei „AG“-Sequenzen liegen, wurden beide Dinukleotide mutiert.

Es ist nicht möglich die Entstehung der E1B-84R-mRNA (Abb. 2.5; 1,02kb-mRNA) ohne Beeinflussung anderer E1B-mRNAs durch Mutation von Spleißstellen zu verhindern. Die Inaktivierung der Spleißdonorstelle SD1 würde alle E1BN-zugehörigen mRNAs betreffen (Abb. 2.5 & 5.1). Eine Mutation der Spleißakzeptorstelle SA3 würde das Intron [SD2-SA3] stören, dass bei der Prozessierung der E1B-55K-, E1B-156R- und E1B-93R-mRNA entfernt wird. Da Introns oft wichtig für den effizienten Kernexport von mRNAs sind, hätte eine solche Mutation wahrscheinlich einen negativen Einfluss auf die Expression aller E1B-Proteine (Cheng *et al.*, 2006; Palmiter *et al.*, 1991). Unveröffentlichte Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe ergaben, dass ein funktionales [SD2-SA3]-Intron tatsächlich wichtig für die effiziente Expression von Plasmid-kodiertem E1B-55K ist (Kristina Schilling & Timo Sieber). Aufgrund dieser Gegebenheiten war es nur möglich durch Einbau eines Stopkodons den individuellen C-Terminus des Proteins abzutrennen. Die zugehörige Virusmutante H5pm4162 (84R Δ C) exprimiert somit statt E1B-84R ein verkürztes Protein, das neben dem gemeinsamen N-Terminus der E1BN-Proteine, abgesehen von einem Glutamin, keinen individuellen C-Terminus mehr enthält (E1B-84R Δ C). Das durch Mutation generierte Stopkodon wurde dabei so positioniert, dass es direkt hinter der für die Funktion des Spleißakzeptors wichtigen Sequenz liegt (Tab. 5.1).

Die Generierung der E1B-55K-defekten Virusmutante H5 pm 4129 (55K⁻) erfolgte ebenfalls durch Einführung von Stopkodons. Da der N-Terminus von E1B-55K auch in allen E1BN-Proteinen zu finden ist, konnten erst hinter der Spleißdonorstelle SD1 zwei Stopkodons eingeführt werden. Theoretisch könnte somit durch Translation der vormals E1B-55K-kodierenden mRNA-Form (Abb. 5.1) ein Restprotein aus dem allgemeinen N-Terminus sowie den sechs nachfolgenden Aminosäuren erzeugt werden. Ein solches Protein, konnte jedoch nie detektiert werden (5.2.3.1).

Neben einer möglichen Instabilität des entstehenden artifiziellen Proteinproduktes tragen wahrscheinlich noch zwei weitere Faktoren zu dieser Tatsache bei. Zum einen wird die verantwortliche 2.28kb-mRNA nur früh in der Infektion dominant exprimiert (Spector *et al.*, 1978) und zum anderen sollten, die in die mRNA eingefügten Stopkodons die mRNA für den raschen Abbau durch *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) markieren. Dieser zelluläre Kontrollmechanismus führt gespleißte mRNAs dem Abbau zu, wenn der kodierende Leserahmen mehr als 55 Nukleotide in 5'-Richtung vor dem letzten Exon/Exon-Übergang (entsteht hier durch Entfernen des Introns [SD2-SA3]; Abb. 2.5) terminiert wird (zur Übersicht: Isken und Maquat, 2007).

In Erweiterung von H5 pm 4129 (55K⁻) wurde H5 pm 4149 (E1B⁻) hergestellt. Diese Virusmutante unterbindet neben der Expression von E1B-55K auch die der E1BN-Proteine. Hierzu wurden insgesamt vier Stopkodons eingefügt. Zusätzlich zu den auch in 55K⁻ eingeführten Stopkodons, wurden kurz hinter dem E1B-55K-Startkodon noch zwei weitere gesetzt.

Für die Studien wurde H5 pm 4132 als Wildtypvirus (Im Folgenden als wt oder Wildtypvirus bezeichnet) verwendet. Es unterscheidet sich von H5 pg 4100 (Groitl und Dobner, 2007) nur durch eine stille Mutation, die die Herstellung und Manipulation adenoviraler Bacmide erleichtert. Die Mutation inaktiviert eine Integrationsstelle des *E. coli*-Transposons TN10 und unterbindet so die Entstehung fehlerhafter, Transposon-haltiger Bacmide. Die Mutation ist im Zentralteil des E1B-55K-Leserahmens lokalisiert und beeinträchtigt weder Leserahmen adenoviraler Proteine noch bekannte Spleißsignale (4.2.3 und 4.3). Entsprechend konnte auch kein signifikanter Unterschied zwischen H5 pg 4100 und H5 pm 4132 hinsichtlich der Produktion der E1B-Proteine beobachtet werden (persönliche Mitteilung: Sabrina

Schreiner). Die in dieser Arbeit verwendeten Virusmutanten basieren auf der H5pm4132-Sequenz. Lediglich, das für E1B-55K sowie für die E1BN-Proteine defiziente Virus E1B⁻ leitet sich vom Vorläuferkonstrukt H5pg4100 her.

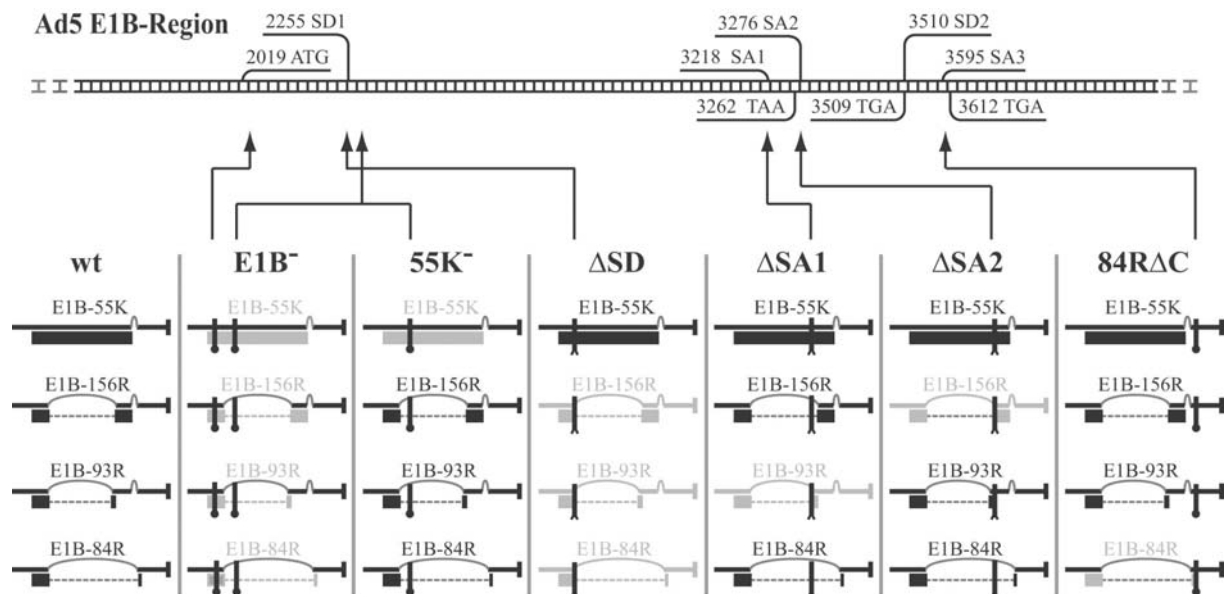


Abb. 5.1: Übersicht der E1B-defizienten Viren. Oben ist die Ad5 E1B-Region mit einigen wichtigen Motiven, sowie deren Position im Genom dargestellt. Darunter sind die verschiedenen Virusmutanten (wt – 84RΔC) mit einer Übersicht der E1B-mRNAs angegeben. Neben den mRNAs sind die Leserahmen der Proteine (E1B-55K, E1B-156R, E1B-93R und E1B-84R) als Rechtecke eingezeichnet. Entfernte Intronsequenzen sind in der RNA als Bögen und in den *orfs* als gestrichelte Linien dargestellt. Die in die mRNA-Übersicht eingezeichneten Markierungen zeigen die eingebrachten Stoppkodons (↓) und die inaktivierten Spleißstellen (λ). Wurden zwei dicht aufeinander folgende, zusammengehörige Stoppkodons eingebracht (Tab. 5.1), sind diese nur durch ein Symbol dargestellt. Die Positionen dieser Veränderungen sind jeweils mit Pfeilen in der oben dargestellten E1B-Region von Ad5 markiert. Wird durch Mutation die Expression eines Proteins verhindert, so ist dessen *orf* grau dargestellt. Kommt dies durch Inaktivierung von Spleißdonor- oder Spleißakzeptorstellen zustande (ΔSD- bzw. ΔSA-Virusmutanten), wurden auch die betroffenen mRNAs grau eingezeichnet. Der *orf* von E1B-19K, der von keiner der eingebrachten Mutationen betroffen ist, ist hier nicht dargestellt.

5.1.2 Verifizierung der E1B-defizienten Viren

Um festzustellen, ob die hergestellten Virusmutanten die geplanten Veränderungen im Expressionsverhalten aufweisen, wurden A549-Zellen mit den verschiedenen Viren (*moi* 20) infiziert, nach 24 h geerntet und auf die Expression der E1B-Proteine hin untersucht (Abb. 5.2). In den durchgeführten *Western Blot*-Analysen wurden E1B-55K und die E1BN-Proteine mit dem Primärantikörper 2A6 spezifisch nachgewiesen (Abb. 5.2 A). Darüber hinaus wurden zum indirekten Nachweis der gebildeten E1B-

mRNAs cDNA-Analysen durchgeführt. Hierzu wurde aus infizierten A549-Zellen (*moi* 20) 24 h p. i. zytoplasmatische mRNA isoliert und durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Durch PCR wurden anschließend spezifische Abschnitte der E1BN-kodierenden cDNAs amplifiziert, im Agarosegel nachgewiesen und durch Sequenzierung identifiziert. Dieser experimentelle Ansatz ist nicht quantitativ, erlaubt jedoch eine sensible, qualitative Aussage über das Auftreten bestimmter E1B-mRNAs bei den einzelnen Virusmutanten (Abb. 5.2 B).

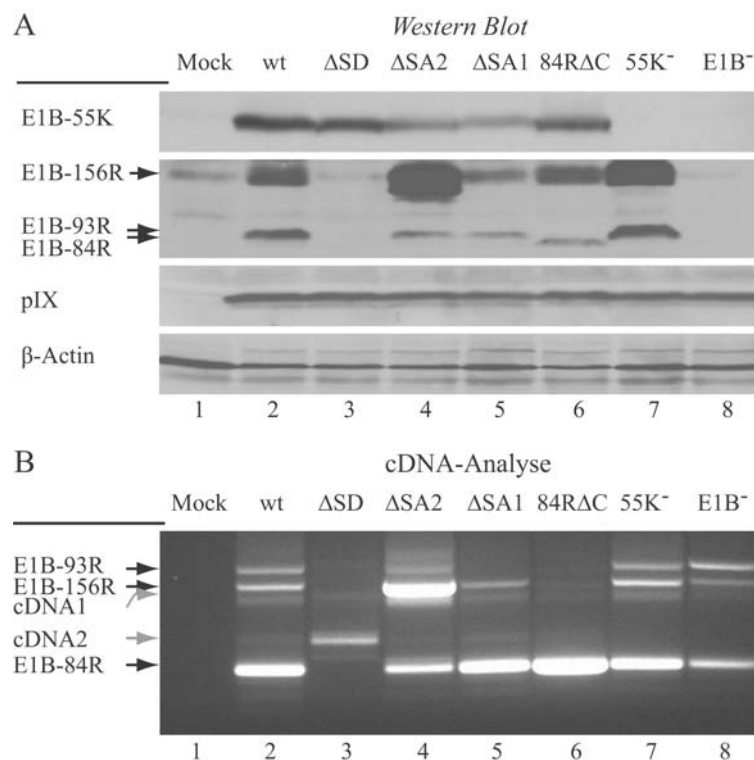


Abb. 5.2: Verifizierung der E1B-defizienten Viren. Die Expression viraler Proteine in mit dem Wildtypvirus (wt) bzw. mit den verschiedenen Virusmutanten infizierten A549-Zellen (*moi* 20) wurde im *Western Blot* und durch eine cDNA-Analyse untersucht. (A) Für den *Western Blot* wurden die Zellen 24 h p. i. geerntet, aufgeschlossen (4.7.2.2) und 100 µg Zelllysate eingesetzt. Als Ladekontrolle wurde β-Actin verwendet. Die E1B-Proteine wurden mit dem Primärantikörper 2A6, pIX mit Anti-pIX und β-Actin mit AC-15 nachgewiesen. (B) Die cDNA-Analyse wurde zur Aufklärung der durch die verschiedenen Virusmutanten hergestellten E1BN-mRNAs durchgeführt. Hierzu wurde 24 h p. i. die zytoplasmatischen mRNAs isoliert und durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Mit den Starter-Oligonukleotiden E1Bmt(BamHI)fwd und E1B84R(EcoRI)rev wurden in einer anschließenden PCR-Reaktion (30 Zyklen) spezifisch kurze E1B-cDNAs vermehrt. Die Elongationszeit wurde dabei so gewählt, dass die lange, E1B-55K-kodierende cDNA nicht amplifiziert wurde. Die gewonnenen PCR-Produkte wurden auf einem 1% Agarosegel aufgetragen. Einzelne Banden wurden aus dem Gel isoliert und durch Sequenzierung exprimierten mRNA-Formen zugeordnet.

Die gewonnenen Daten bestätigen die Expression von E1B-55K (55kDa), E1B-156R (20kDa), E1B-93R (17kDa) und E1B-84R (16kDa) sowie der zugehörigen mRNA-Formen durch das Wildtypvirus (Abb. 5.2; Spur 2). Aufgrund des ähnlichen Laufverhaltens und der schwachen Expression waren E1B-93R und E1B-84R in den durchgeführten *Western Blot*-Analysen nicht eindeutig zu unterscheiden (Abb. 5.2 A). Die cDNA-Analysen erlaubten jedoch eine eindeutige Zuordnung (Abb. 5.2 B), die in späteren Analysen bestätigt werden konnte (Abb. 5.6).

In Zellen, die mit den Virusmutanten 55K⁻ und E1B⁻ (Abb. 5.2; Spur 7 & 8) infiziert wurden, konnte wie erwartet kein E1B-55K bzw. kein E1B-156R und keine E1BN-Proteine nachgewiesen werden. Die Expression von E1B-156R und E1B-93R/E1B-84R wurde hingegen für 55K⁻ gezeigt. Die Expression aller drei E1BN-Proteine für 55K⁻ wurde auch durch den Nachweis der E1B-93R-, E1B-156R- und E1B-84R-kodierender mRNA-Formen in der cDNA-Analyse bestätigt. Dieselben cDNA-Fragmente wurden auch für E1B⁻ gezeigt. Durch Sequenzierung konnte hier die Unterbrechung der Leserahmen durch die eingefügten Stopkodons bestätigt werden.

Auch für die Virusmutante 84RΔC (Abb. 5.2; Spur 6) konnten alle erwarteten E1B-Proteine gezeigt werden. Das in den Leserahmen von E1B-84R eingefügte Stopkodon äußerte sich in einem verkürzten Proteinprodukt (E1B-84RΔC) im *Western Blot* und konnte durch Sequenzierung der cDNA bestätigt werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die eingefügte Mutation, nicht mit dem Spleißprozess an der angrenzenden Spleißakzeptorstelle SA3 interferiert. Die cDNA-Banden, die den E1B-93R- und E1B-156R-kodierenden mRNAs entsprechen waren in der cDNA-Analyse nur sehr schwach detektierbar; jedoch zeigte die *Western Blot*-Analyse keinen Hinweis auf signifikante Unterschiede in den Gleichgewichtsmengen der beiden E1BN-Proteine für 84RΔC im Vergleich zum Wildtypvirus (Abb. 5.2 & 5.6).

Für ΔSA1 (Abb. 5.2; Spur 5), in der selektiv kein E1B-93R gebildet werden sollte, konnte weder das E1B-93R-Protein noch die zugehörige cDNA nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass die Spleißakzeptorstelle SA1 erfolgreich durch Mutation inaktiviert wurde. E1B-55K, E1B-156R und E1B-84R wurden wie erwartet gebildet.

In ΔSA2-infizierten Zellen (Abb. 5.2 A; Spur 4) konnten durch *Western Blot*-Analysen wie erwartet E1B-93R- und E1B-84R nachgewiesen werden. Überraschenderweise wurde aber auf Laufhöhe des E1B-156R-Proteins eine E1B-spezifische Bande

detektiert. Die Sequenzierung des zugehörigen cDNA-Fragments (Abb. 5.2 B; cDNA1) zeigte, dass es nach Inaktivierung der Spleißakzeptorstelle 2 (SA2) zur Nutzung einer bis dahin wohl inaktiven kryptischen Spleißakzeptorstelle kommt (Tab. 5.2). Das als neue Akzeptorstelle SA2.2 genutzte „AG“ Dinukleotid lag 6 bp in 3'-Richtung hinter SA2 und führte zur Expression eines E1B-Proteins mit 154 Aminosäureresten (E1B-154R). Aufgrund der starken Expression dieses artifiziellen Proteins und seiner großen Ähnlichkeit zu E1B-156R, ist Δ SA2 nicht zur Untersuchung der Funktionen von E1B-156R in der Virusinfektion geeignet.

Um dennoch ein Virus zu erhalten, das selektiv kein E1B-156R bilden kann, wurde das E1-Box Δ SA2-Plasmid zu E1-Box Δ SA2.2 weiter verändert (Tab. 5.2). Hierbei wurden der neue Spleißakzeptor sowie das nächste 3'-gelegene „AG“ durch geeignete Basenaustausche als Spleißstellen unbrauchbar gemacht.

E1-Box	Sequenz	Konsensussequenz	CCCCCCC _N C _C AG _G	SA [bp]
		Spleißakzeptorstelle	TTTTTTT T A	
TNEX6	...GATATTGCTT AG CCCGAGAGCATGTCCAAGGTG...			3276
Δ SA2	...GATATTGCTTGA A CCCG AG AGCATGTCCAAGGTG...			3282
Δ SA2.2	...GATATTGCTTGA A CCCGA AT CCATGTCCA AG GTG...			3294

Tab. 5.2: Inaktivierung der Spleißakzeptorstelle SA2 induziert die Nutzung alternativer Spleißakzeptoren. Um ein E1B-156R-defizientes Virus herzustellen wurde versucht, die für die Synthese des Proteins erforderliche Spleißakzeptorstelle (SA2) zu inaktivieren. Wie anhand der Konsensussequenz eukaryotischer Spleißakzeptorstellen (oben) deutlich wird, ist für die Funktion insbesondere das konservierte „AG“ Dinukleotid (Fett-Druck) an der Intron/Exon-Grenze notwendig (5.1.1). Bei Mutation (rot gekennzeichnet) dieses Motivs wurde jedoch mehrfach das nächste 3'-gelegene „AG“ Dinukleotid als Ersatz-Spleißakzeptor genutzt (blau hinterlegt). In der linken Spalte sind die zugehörigen E1-Boxen angegeben, rechts die Positionen des A im „AG“ Dinukleotid des aktiven Spleißakzeptors (SA) im Ad5-Genom notiert.

Da das Spleißen der E1B-mRNAs auch auf Plasmidebene stattfindet (5.3.1), wurden zur Untersuchung der Wirkung dieser neuen Mutationen cDNA-Analysen transfizierter H1299-Zellen durchgeführt. Diese ergaben, dass ähnlich wie bei Δ SA2 auch im neuen Konstrukt das nächste in 3'-Richtung hinter SA2 verfügbare „AG“ als Akzeptor genutzt wurde. Da noch weitergehende Mutation auch die Gefahr einer Störung möglicher regulatorischer Elemente (z.B. für Spleißprozesse und Transkription) erhöhen würden, wurde der Versuch ein E1B-156R-defizientes Virus zu

generieren abgebrochen. Ein möglicherweise auftretender Phänotyp wäre in einer solchen Mutante wahrscheinlich nicht mehr eindeutig dem E1B-156R-Verlust zuzuordnen gewesen.

Die Untersuchungen von Zellen die mit Δ SD infiziert wurden zeigten, dass wie erwartet weder E1BN-Proteine noch die zugehörigen mRNA-Formen exprimiert werden. Auffällig war jedoch das deutliche Auftreten einer cDNA-Form (Abb. 5.2 B cDNA2) deren Größe zwischen der der E1B-156R- und der E1B-84R-Form lag. Durch Sequenzierung, sowie durch eine analoge für Ad2 beschriebene mRNA (Montell *et al.*, 1984), konnte die cDNA einer 1,10 kb-mRNA zugeordnet werden. In dieser mRNA-Form wird der Verlust der Spleißdonorstelle SD1 durch die Nutzung einer in 3'-Richtung liegenden, kryptischen Sequenz an Position 2326 (bezogen auf das linke Ende des Ad5-Genoms) kompensiert. Die mRNA kodiert neben E1B-19K ein potenzielles 107 Aminosäuren großes Protein (E1B-107R), das sich aus dem 102 Aminosäuren langen n-terminalen Bereich von E1B-55K sowie dem C-Terminus von E1B-84R zusammensetzt. Da ein solches Protein jedoch, trotz geeigneter Antikörper, weder hier (Abb. 5.2 & 5.6) noch bei Ad2 (Montell *et al.*, 1984) nachgewiesen werden konnte, wird es wohl nicht exprimiert oder kann sich aufgrund niedriger Stabilität nicht in detektierbarem Maße anreichern.

Bei Betrachtung der cDNA-Analyse verschiedener Virusmutanten (Abb. 5.2 B) fällt auf, dass neben den Banden, die den E1BN-Proteinen zugeordnet werden können, weiter schwache Banden auftreten. Es ist somit denkbar, dass weitere, sehr seltene mRNAs existieren, die durch den Gebrauch kryptischer Spleißstellen generiert werden. Von solchen mRNAs kodierte hypothetische E1B-Proteine konnten allerdings mit keinem verfügbaren E1B-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden.

Neben den dargestellten Veränderungen in der Expression der E1B-Proteine, ist auch eine Beeinflussung der pIX-Transkriptionseinheit durch die eingeführten Mutationen vorstellbar. Die Transkriptionseinheit des adenoviralen Strukturproteins pIX wird von der E1B-Region überlagert (Abb. 2.3) und durch deren Transkription reprimiert (Vales und Darnell, 1989; Wilson *et al.*, 1979). Da die eingefügten Basenaustausche außerhalb des pIX-Promotors und Leserahmens liegen und keinen Einfluss auf die Aktivität des E1B-Promotors haben sollten, ist eine Beeinträchtigung jedoch

unwahrscheinlich. Durch den einheitlichen Nachweis von pIX für alle Virusmutanten (Abb. 5.2 A) konnte schließlich ausgeschlossen werden, dass ein möglicher Phänotyp durch eine Beeinflussung der pIX-Expression hervorgerufen wird.

5.2 Charakterisierung der E1B-defizienten Viren

Nach erfolgreicher Verifizierung der hergestellten E1B-defizienten Viren wurden diese in Infektionsversuchen untersucht, um den eingebrachten Veränderungen spezifische Phänotypen zuordnen zu können.

Hierzu wurde zuerst untersucht, ob es zu Defekten in der Nachkommenvirenproduktion oder bei der Synthese später Strukturproteine kommt. Anschließend wurde versucht die möglichen Funktionen der Proteine näher einzugrenzen. Da die E1BN-Proteine strukturell mit dem gut untersuchten E1B-55K verwandt sind ist es denkbar, dass sie auch mit einigen von dessen Interaktionspartnern wechselwirken. Dies könnte neben individuellen Wirkungen der E1BN-Proteine auch zu einer indirekten Regulation der E1B-55K-Aktivitäten führen.

Aufgrund dieser Überlegungen wurden hauptsächlich E1B-55K-abhängige Prozesse sowie Interaktionspartner des Onkoproteins auf Beeinflussung durch die E1BN-Proteine hin untersucht.

5.2.1 Produktion infektiöser Nachkommenviren

Es ist bekannt, dass Adenoviren mit Mutationen in E1B-55K, häufig starke Replikationsdefekte zeigen (Barker und Berk, 1987; Pilder *et al.*, 1986; Yew *et al.*, 1990). Da in einigen der untersuchten Viren auch die E1BN-Proteine durch die eingeführten Mutationen inaktiviert oder verändert wurden, ist vorstellbar dass ihr Defekt zum beobachteten Phänotyp beiträgt. Um zu überprüfen ob dies auch auf die hier hergestellten Virusmutanten zutrifft wurde die Produktion infektiöser Nachkommenviren in A549-Zellen (*moi* 10) 24, 48 und 72 h nach Infektion wie unter 4.5.3 beschrieben bestimmt (Abb. 5.3).

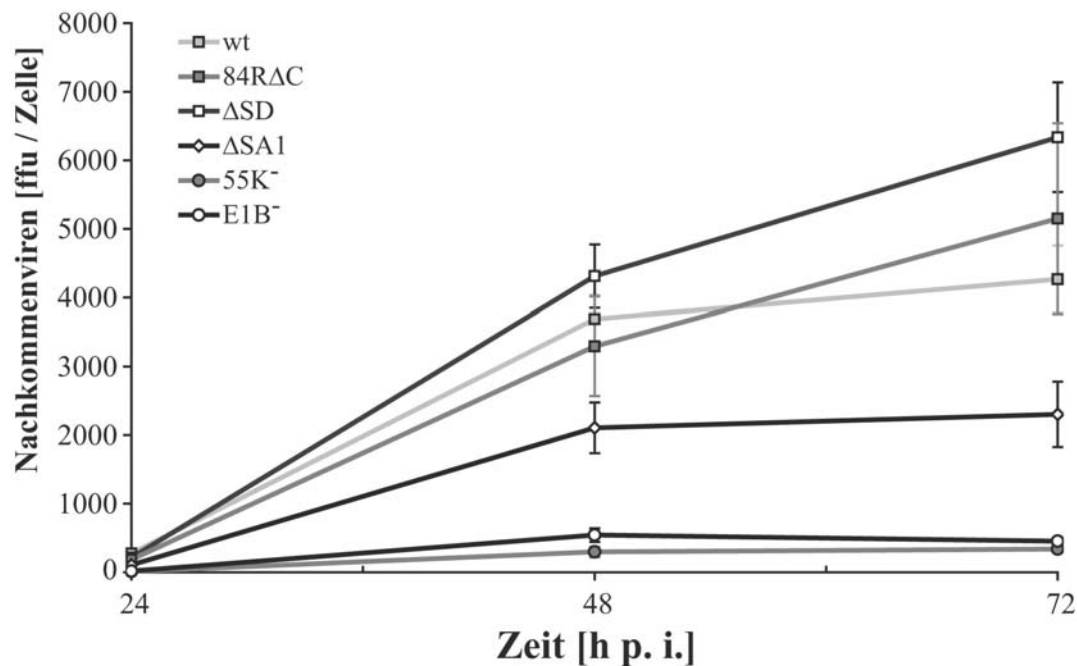


Abb. 5.3: Produktion infektiöser Nachkommenviren. A549-Zellen wurden mit den verschiedenen Viren (wt, 84RΔC, ΔSD, ΔSA1, 55K⁻, und E1B⁻ je *moi* 10) infiziert und die Menge gebildeter Nachkommenviren zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (24, 48, 72 h p. i.) wie unter 4.5.5 beschrieben bestimmt.

Hierbei verhielten sich das Wildtypvirus (wt) sowie ΔSD und 84RΔC sehr ähnlich und ließen sich im Rahmen der Messgenauigkeit nicht voneinander unterscheiden. Auffällig war jedoch die Virusmutante ΔSA1 die zu allen Zeitpunkten weniger Nachkommenviren produzierte als das Wildtypvirus. Die Virusmutanten, die nicht in der Lage waren E1B-55K zu bilden (55K⁻ und E1B⁻) zeigten wie erwartet den stärksten Defekt (Reduktion auf ca. 1/13 bzw. 1/12).

5.2.2 Synthese später Strukturproteine

E1B-55K-defekte Virusmutanten zeigen häufig neben einer verminderten Replikationsfähigkeit auch eine reduzierte oder verspätete Synthese viraler Strukturproteine. Eine Ursache hierfür ist wahrscheinlich die Beteiligung des E1B-55K/E4orf6-Komplexes am selektiven Kernexport der späten viralen mRNAs die in der Hauptsache Strukturproteine kodieren (Babiss und Ginsberg, 1984; Babiss *et al.*, 1985; Blanchette *et al.*, 2008; Gonzalez und Flint, 2002; Leppard und Shenk, 1989; Pilder *et al.*, 1986; Woo und Berk, 2007). Da die Virusmutanten teilweise Defekte in der

Produktion infektiöser Nachkommenviren zeigen (Abb. 5.3), wurde die Synthese der viralen Strukturproteine im Infektionsverlauf untersucht (Abb. 5.4). Hierzu wurden A549-Zellen mit den hergestellten Virusmutanten infiziert, und innerhalb eines Zeitraums von 72 h zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Anschließend wurde die Expression der viralen Strukturproteine durch *Western Blot*-Analysen untersucht.

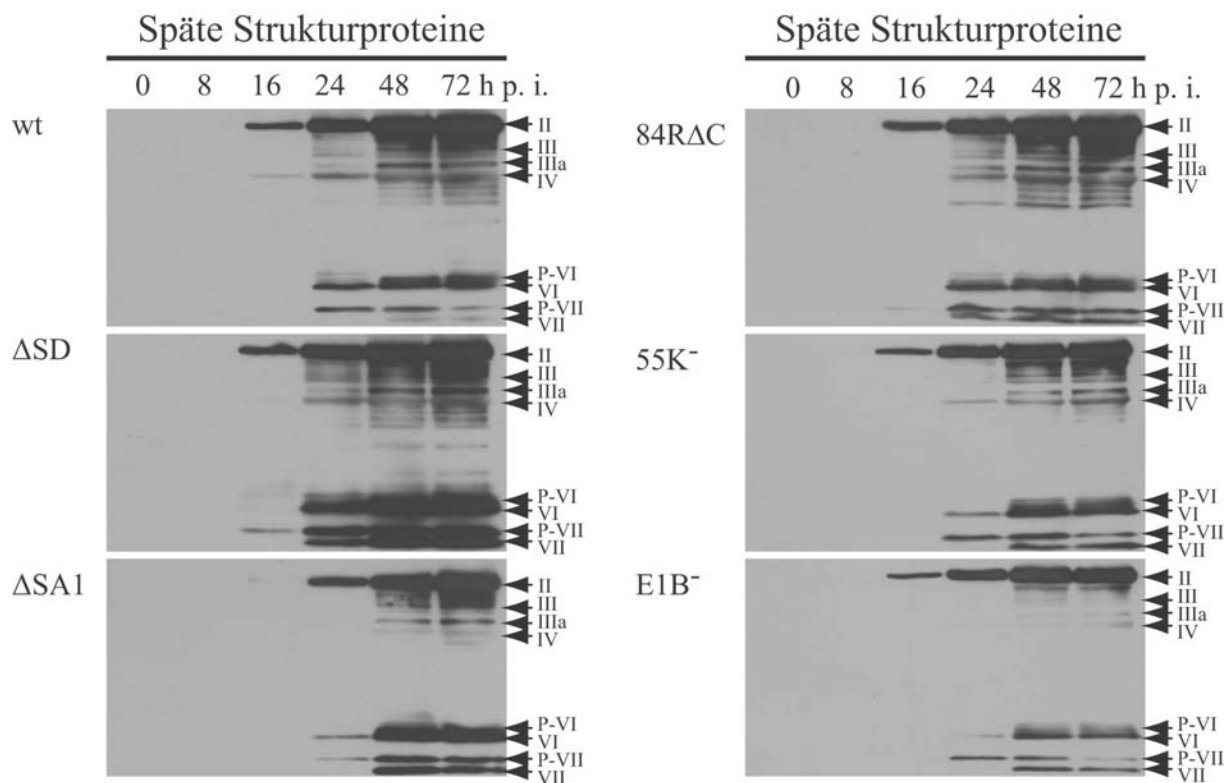


Abb. 5.4: Synthese später viraler Strukturproteine. A549-Zellen wurden mit *moi* 50 des Wildtypvirus (wt) bzw. der Virusmutanten ΔSD, ΔSA1, 84RΔC, 55K⁻ oder E1B⁻ infiziert, nach 8, 16, 24, 48 bzw. 72 h geerntet und in NP-40-Lysepuffer aufgeschlossen. Nicht-infizierte Zellen („0“) dienten als Negativkontrolle. Je 15 µg der so gewonnenen Lysate wurden auf einem 10% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und im *Western Blot* eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem polyklonalen Primärantikörper α-Late. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Banden wurden aufgrund ihrer elektrophoretischen Mobilität den folgenden Proteinen zugeordnet: II: Hexon (120 kDa); III: Penton (80 kDa); IIIa: L1-IIIa (66 kDa); IV: Fiber (62 kDa); P-VI: L3-VI-Vorläuferprotein (27 kDa); VI: L3-VI (23,5 kDa); P-VII: L2-VII-Vorläuferprotein (20 kDa); VII: L2-VII (18,5 kDa). Daneben treten im Infektionsverlauf noch andere virusspezifische Banden auf, die wahrscheinlich weiteren Strukturproteinen oder deren Vorläufern zuzuordnen sind, hier jedoch nicht identifiziert werden konnten (Anderson *et al.*, 1973; Modrow und Falke, 2002; Vellinga *et al.*, 2005).

Während die Viren wt, ΔSD und 84RΔC ein ähnliches Expressionsverhalten aufweisen, zeigen die E1B-55K-negativen Viren 55K⁻ und E1B⁻, wie erwartet, einen Defekt (Abb. 5.4). Zwar können auch bei ihnen bereits nach 16 h erste Struktur-

proteine (Hexon; II) detektiert werden, jedoch steigen die Gleichgewichtsmengen im Vergleich zu Wildtypvirus deutlich langsamer und weniger stark an. Dies gilt insbesondere für die Hauptstrukturproteinen Hexon (II), Penton (III) und Fiber (IV). Δ SA1 zeigt ebenfalls eine beeinträchtigte Strukturproteinsynthese. Hier kann eine deutliche Hexon-Expression erst 24 h nach Infektion detektiert werden. Auch die anderen Strukturproteine treten verzögert auf.

5.2.3 E1B-Proteine im Infektionsverlauf

Um zu bestimmen, ob es durch die gezielte Inaktivierung einzelner E1B-Proteine zu Veränderungen im Auftreten der anderen E1B-Proteine im Infektionsverlauf kommt, wurden deren Gleichgewichtsmengen, Expressionskinetiken sowie ihre subzelluläre Verteilung untersucht.

5.2.3.1 Gleichgewichtsmengen der E1B-Proteine

Die Gleichgewichtsmengen von E1B-55K und die der E1BN-Proteine unterscheiden sich in der Infektion deutlich voneinander, so dass eine gemeinsame Darstellung der Proteine schwierig ist. Um dennoch zumindest eine ungefähre Einschätzung der Signalintensitäten und somit der relativen Proteinmengen zu ermöglichen, wurden die Mengen an E1B-Proteinen in wt-infizierten A549-Zellen densitometrisch erfasst (Abb. 5.5). Hierzu wurden A549-Zellen mit *moi* 50 des Wildtypvirus infiziert, nach 72 h p. i. geerntet und die gewonnenen Lysate im *Western Blot* eingesetzt.

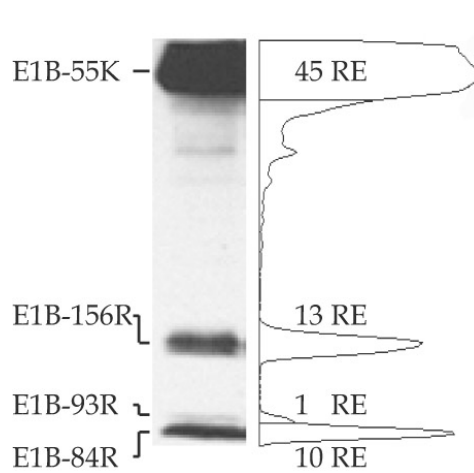


Abb. 5.5: Quantifizierung der E1B-55K- und E1BN-Gleichgewichtsmengen. A549-Zellen wurden mit wt infiziert (*moi* 50) und 72 h p. i mit NP-40 lysiert. 120 µg Lysat wurden über ein 15% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und im *Western Blot* eingesetzt. Die Detektion erfolgte mittels 2A6. Die rechts der Banden dargestellte densitometrische Kurve ermöglicht eine relative Quantifizierung der E1B-Proteine, da die Fläche der jeweiligen *Peaks* proportional zur Gleichgewichtsmenge der Proteine ist. Die Proteinmenge wurde in relativen Einheiten (RE) angegeben, wobei das Signal von E1B-93R gleich 1 gesetzt wurde. Die Analyse erfolgte mit Scion Image.

Bei der Analyse zeigte sich, dass unter Bedingungen die eine Detektion von E1B-93R ermöglichen, das Signal für E1B-55K schon am Sättigungsbereich lag. Daher ist die tatsächliche E1B-55K-Menge möglicherweise größer als der bestimmte Wert. Die Auswertung zeigte somit, dass in den Zellen mindestens 45-mal mehr E1B-55K vorlag als E1B-93R. Auch war im Vergleich zu E1B-93R deutlich mehr E1B-156R (13-mal) und E1B-84R (10-mal) vorhanden. Aufgrund dieser großen Konzentrationsunterschiede wurden in der folgenden Analyse unterschiedliche Signalverstärkungen für E1B-55K und die E1BN-Proteine verwendet.

Da die in die Viren eingebrachten Mutationen teilweise Spleißprozesse verändern und auch eine wechselseitige Stabilisierung/Destabilisierung der E1B-Proteine vorstellbar ist, wurden die Gleichgewichtsmengen von E1B-55K und der E1BN-Proteine im Infektionsverlauf untersucht.

Hierzu wurden A549-Zellen mit *moi* 50 der verschiedenen Virusmutanten infiziert. Nach 8, 16, 24, 48 und 72 h wurden Zellen geerntet und die Proben im *Western Blot* mit dem E1B-spezifischen Primärantikörper 2A6 untersucht (Abb. 5.6). Die Probe die hierbei 72 h p i aus den Wildtypvirus-infizierten Zellen gewonnen wurde ist dabei Identisch mit der densitometrisch vermessenen Probe (Abb. 5.5)

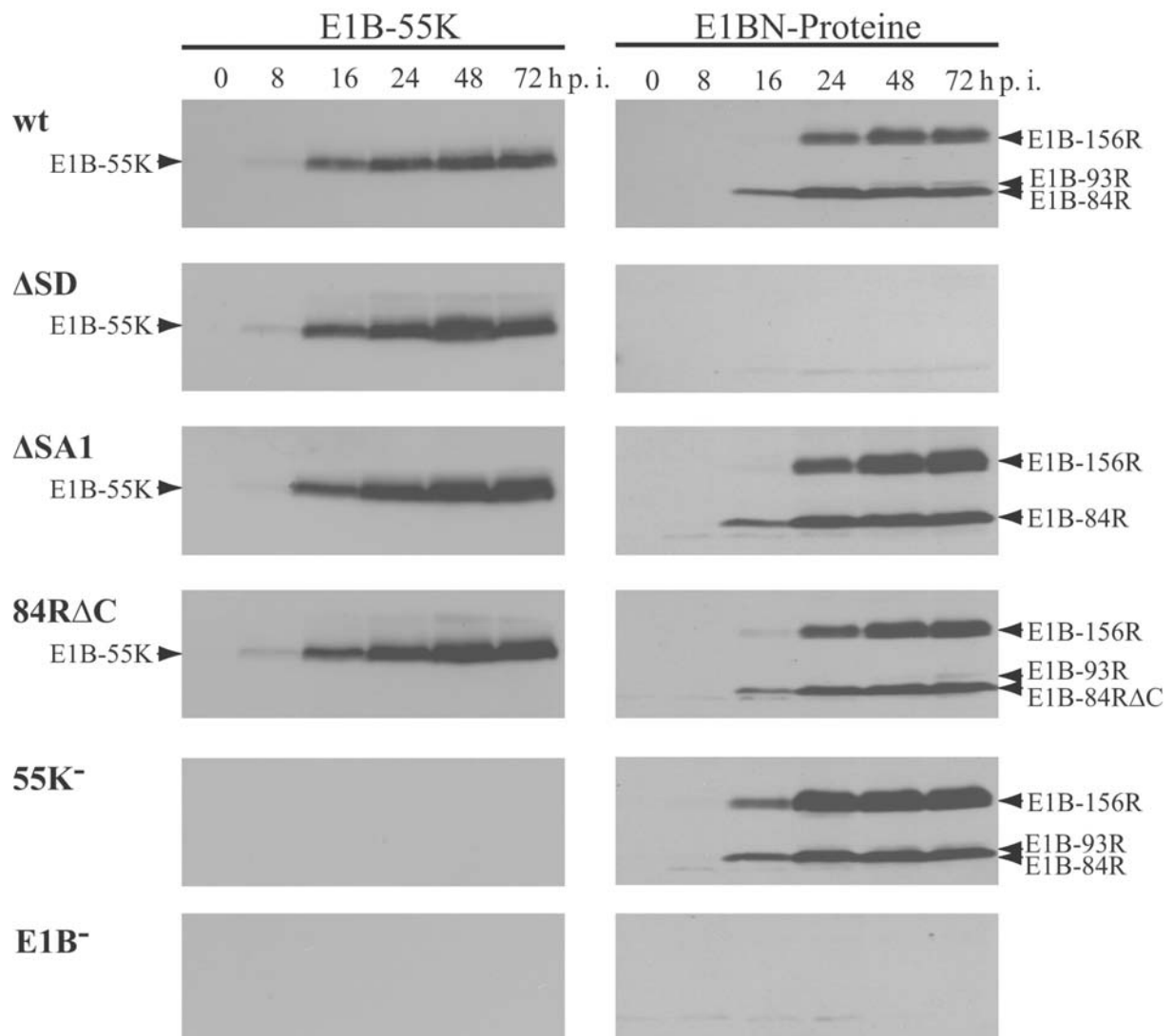


Abb. 5.6: Auftreten von E1B-55K und den E1BN-Proteinen im Infektionsverlauf. A549-Zellen wurden mit *moi* 50 des Wildtypvirus (wt) bzw. der Virusmutanten Δ SD, Δ SA1, 84R Δ C, 55K⁻ oder E1B⁻ infiziert, nach 8, 16, 24, 48 bzw. 72 h geerntet und in NP-40-Lysepuffer aufgeschlossen. Nicht-infizierte Zellen („0“) dienten als Negativkontrolle. Je 120 μ g der so gewonnenen Lysate wurden in einem 15% SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und im *Western Blot* eingesetzt. Die Detektion von E1B-55K, E1B-156R, E1B-93R und E1B-84R erfolgte mit dem Primärantikörper 2A6. Die Positionen der Proteine sind mit Pfeilspitzen markiert. In der Virusmutante 84R Δ C entsteht anstatt des E1B-84R-Proteins ein verkürztes Produkt (E1B-84R Δ C), das ebenfalls mittels 2A6 detektiert werden kann.

In Wildtypvirus-infizierten Zellen wurden E1B-55K und die E1BN-Proteine wie erwartet nachgewiesen (Abb. 5.6). Eine Expression von E1B-55K konnte dabei bereits 8 h nach Infektion beobachtet werden. Die Gleichgewichtsmenge des Proteins nahm im weiteren Infektionsverlauf noch zu. E1B-84R konnte ab 16 h p. i. nachgewiesen werden. Die Intensität des Signals erreichte 24 h p. i. ein Maximum und blieb im weiteren Verlauf konstant. Auch E1B-156R und E1B-93R zeigten ein ähnliches

Expressionsverhalten, wobei sie erstmals 24 h nach Infektion zu detektieren waren und nach 48 h ihre höchste Gleichgewichtsmengen erreichten.

Die E1B-55K-Expression der mit Δ SD-infizierten Zellen entsprach zu den frühen Zeitpunkten der Wildtypvirus-infizierter Zellen, nach 24 h schienen jedoch höhere E1B-55K Gleichgewichtsmengen vorzuliegen. Wie erwartet konnten keine E1BN-Proteine detektiert werden.

Die in Δ SA1 eingeführte Mutation verhinderte die Expression von E1B-93R. Auffällig war hier eine im Vergleich zum Wildtypvirus erhöhte E1B-156R-Gleichgewichtsmenge, so dass das Protein bereits nach 16 h schwach nachweisbar war. In der E1B-55K-Expression unterschied sich Δ SA1 hingegen nicht signifikant von Δ SD.

Auch 84R Δ C-infizierte Zellen zeigten eine ähnliche Expressionskinetik für E1B-55K und E1B-156R. Von der Virusmutante wird statt E1B-84R ein, um den individuellen C-Terminus verkürztes Restprotein E1B-84R Δ C exprimiert. Die durch die Verkürzung des Proteins bedingte höhere elektrophoretische Mobilität, zeigt sich im vergrößerten Abstand zwischen E1B-93R und E1B-84R Δ C (Abb. 5.6).

Die Einführung von Stopkodons in den E1B-55K-Leserahmen verhindert die Produktion des Volllängenproteins durch 55K⁻. Ein möglicherweise eigenständig exprimierte N-Terminus (5.1.1) konnte in keinem Experiment beobachtet werden (Abb. 5.2 & 5.6). Aufgrund der ähnlichen Größe (85 Aminosäuren) ist jedoch nicht auszuschließen, dass die E1B-84R-Bande das Signal überlagert. Da aber im Vergleich zum Wildtypvirus keine deutliche Zunahme der E1B-84R-Bandenintensität beobachtet wurde, ist anzunehmen, dass das Protein wahrscheinlich nur in geringsten Mengen vorliegt. Auffällig ist hingegen das durch den Verlust von E1B-55K induzierte starke und frühe Auftreten von E1B-156R.

Für die Virusmutante E1B⁻ konnte, wie erwartet zu keinem Zeitpunkt ein E1B-Protein mit dem spezifischen Antikörper 2A6 nachgewiesen werden.

5.2.3.2 Lokalisation von E1B-55K und p53 in infizierten Zellen

E1B-55K zeichnet sich durch eine komplexe intrazelluläre Verteilung aus (Gonzalez und Flint, 2002; Ornelles und Shenk, 1991) und liegt in infizierten Zellen diffus in Kern und Zytoplasma vor. Auch wurde eine Lokalisation in den viralen

Replikationszentren beschrieben (Ornelles und Shenk, 1991). Besonders auffällig ist jedoch die Akkumulation in kernnahen Strukturen (*perinuclear bodies*) bei denen es sich möglicherweise um Aggresomen handelt (Liu *et al.*, 2005). In diesen Strukturen sequestriert E1B-55K auch verschiedene zelluläre Proteine wie z. B. p53 (Zantema *et al.*, 1985).

Da eine veränderte E1B-55K-Verteilung auf funktionelle Defekte hinweisen könnte, wurden die Lokalisation des Volllängenproteins und die von p53 untersucht. Hierzu wurden A549-Zellen mit den verschiedenen Adenoviren infiziert, nach 16 h fixiert und E1B-55K sowie p53 durch Immunfluoreszenz-Analysen nachgewiesen (Abb. 5.7).

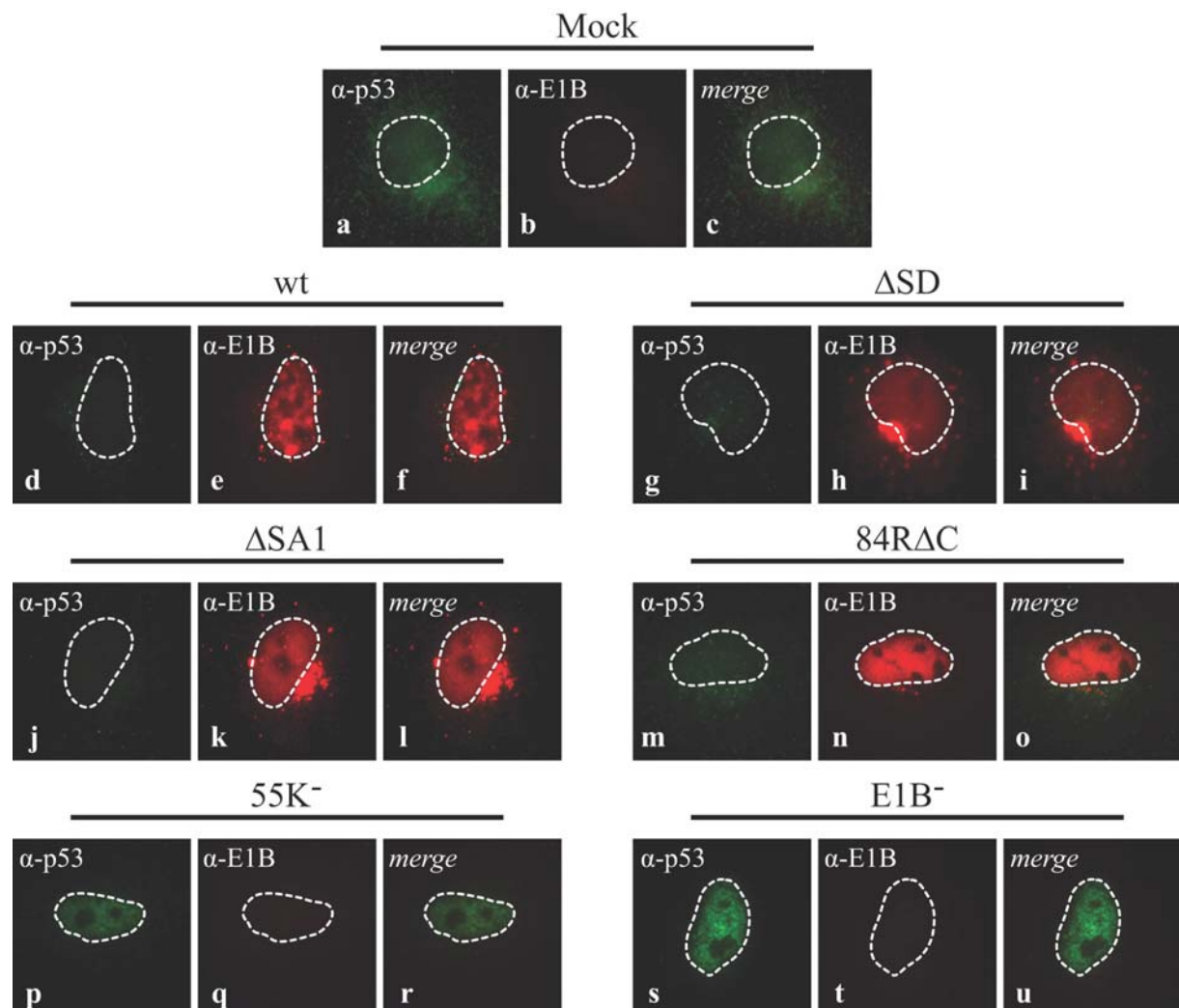


Abb. 5.7: Lokalisation von E1B-55K und p53 in infizierten Zellen. Subkonfluent gewachsene A549-Zellen wurden mit *moi* 50 der verschiedenen Viren (wt, Δ SD, Δ SA1, 84R Δ C, 55K⁻ und E1B⁻) infiziert. Die nicht infizierte Kontrolle ist hier als „Mock“ bezeichnet. 16 h nach Infektion wurden die Zellen geerntet, mit PFA fixiert (4.7.7) und *in situ* mit dem E1B-spezifischen Maus-Hybridom-Überstand 2A6 und dem gegen p53 gerichteten Kaninchen-Antikörper FL-393 doppelmarkiert. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte

mit einem *TexasRed*-gekoppelten anti-Maus-Antikörper und einem FITC-gekoppelten anti-Kaninchen-Antikörper. Somit sind E1B-55K und die E1BN-Proteine grün (α -E1B; b, e, h, k, n, q, t) und p53 rot (α -p53; a, d, g, j, m, p, s) markiert. Überlagerungen beider Signale (*merge*; c, f, i, l, o, r, u) zum Nachweis von Kolo-kalisation sind ebenfalls dargestellt. Die Ränder der Zellkerne sind jeweils als gestrichelte Linie dargestellt.

Für die Immunfärbung wurde ein Zeitpunkt 16 h nach Infektion gewählt, da hier bereits hohe E1B-55K-Gleichgewichtsmengen vorliegen, während sich die E1BN-Proteine im *Western Blot* nur schwach nachweisen lassen (5.2.3.1). Entsprechend konnte bei dieser Untersuchung der mit dem E1B-55K-defizienten Virus 55K⁻ infizierten Zellen wurden kein E1B-spezifisches Signal detektiert werden (Abb. 5.7). Somit scheint die vorhandene Menge der gebildeten E1BN-Proteine in diesem Ansatz nicht detektierbar zu sein. Da jedoch die Gleichgewichtsmengen der E1BN-Proteine bei Infektionen mit den anderen untersuchten Viren eher schwächer waren als bei 55K⁻ (Abb. 5.6) ist davon auszugehen, dass die bei den anderen Viren beobachteten Fluoreszenzsignale allein auf E1B-55K zurückgehen.

In Zellen die mit dem Wildtypvirus infiziert wurden, zeigt E1B-55K 16 h nach Infektion, wie erwartet, eine diffuse zelluläre Verteilung. Darüber hinaus wurden Strukturen am oder im Kern angefärbt. p53 war in diesen Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen nur schwach detektierbar und kolokalisierte teilweise mit E1B-55K in den kernnahen Strukturen.

Ähnliche Verteilungen für E1B-55K und p53 ergaben sich in Δ SD- und Δ SA1-infizierten Zellen. Anders verhielt sich hingegen 84R Δ C, da E1B-55K hier fast ausschließlich diffus im Zellkern lokalisiert war und kaum kernnahe Strukturen ausbildete. Auch in diesen Zellen konnte p53 nur schwach in Zytoplasma und Kern nachgewiesen werden.

In E1B⁻-infizierten Zellen konnte wie erwartet mit 2A6 kein E1B-spezifisches Signal gezeigt werden. Dasselbe traf, wie bereits oben erwähnt, auch auf 55K⁻-infizierte Zellen zu. Beide Viren zeigten außerdem, die für E1B-55K-defiziente Viren beschriebene diffuse p53-Akkumulation im Zellkern (Grand *et al.*, 1994). Ursache hierfür ist der durch die Infektion entstehende Zellstress der p53 stabilisiert und im Kern konzentriert (Liang und Clarke, 2001).

5.2.4 Gleichgewichtsmengen viraler und zellulärer E1B-55K-Interaktionspartner

Da alle E1BN-Proteine E1B-55K-homologe Bereiche besitzen, ist es vorstellbar, dass sie Funktionen von E1B-55K direkt oder indirekt durch kompetitive Wechselwirkungen mit dessen viralen und zellulären Interaktionspartnern beeinflussen.

Um festzustellen ob E1B-55K-abhängige Prozesse durch die E1BN-Proteine beeinflusst werden, wurden die Gleichgewichtsmengen relevanter zellulärer und viraler Proteine in infizierten Zellen überprüft. Hierzu wurden A549-Zellen mit *moi* 50 der verschiedenen Virusmutanten infiziert. Nach 8, 16, 24, 48 und 72 h wurden Zellen geerntet, aufgeschlossen und die Gleichgewichtsmengen der Zielproteine im *Western Blot* untersucht.

5.2.4.1 Gleichgewichtsmengen von E4orf6

E4orf6 ist einer der wichtigsten viralen Interaktionspartner von E1B-55K. Zusammen führen beide Proteine zur Ausbildung eines E3-Ubiquitin-Ligasekomplexes der den selektiven Export später viraler mRNAs aus dem Kern und den proteasomalen Abbau zellulären Faktoren vermittelt (Babiss *et al.*, 1985; Baker *et al.*, 2007; Blanchette *et al.*, 2008; Cutt *et al.*, 1987; Gonzalez und Flint, 2002; Harada *et al.*, 2002; Mohammadi *et al.*, 2004; Pilder *et al.*, 1986; Querido *et al.*, 2001; Sarnow *et al.*, 1984; Stracker *et al.*, 2002; Weinberg und Ketner, 1986; Woo und Berk, 2007). Aufgrund dieser zentralen Bedeutung von E4orf6 für viele Funktionen von E1B-55K wurden die Gleichgewichtsmengen des Proteins im Infektionsverlauf erfasst (Abb. 5.8).

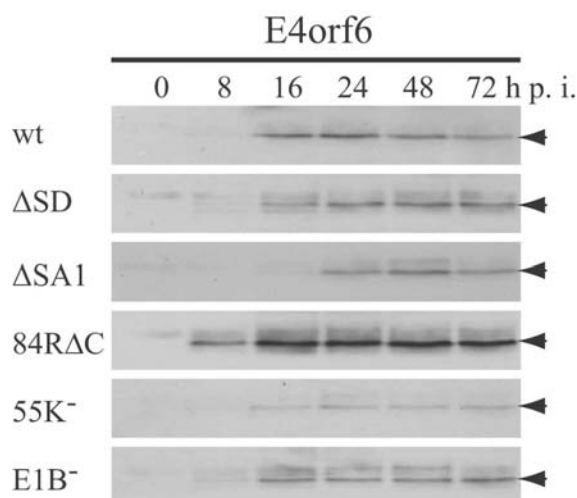


Abb. 5.8: E4orf6-Gleichgewichtsmengen im Infektionsverlauf. A549-Zellen wurden mit *moi* 50 des Wildtypvirus (wt) bzw. der Virusmutanten Δ SD, Δ SA1, 84R Δ C, 55K⁻ oder E1B⁻ infiziert, nach 8, 16, 24, 48 bzw. 72 h geerntet und in NP-40-Lysepuffer aufgeschlossen. Nicht-infizierte Zellen („0“) dienten als Negativkontrolle. Je 30 μ g der so gewonnenen Lysate wurden auf einem 10% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und im *Western Blot* eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit RSA3. Die Pfeile zeigen jeweils die zugehörige E4orf6-Bande an.

Bei den Viren wt und Δ SD, 55K⁻ und E1B⁻ konnte E4orf6 zwischen 16 und 72 h p. i. in stabiler Konzentration nachgewiesen werden. Die Gleichgewichtsmengen waren dabei für wt, Δ SD und E1B⁻ vergleichbar. Nur für 55K⁻-infizierte Zellen konnte zu allen Zeitpunkten weniger E4orf6 beobachtet werden.

Für Δ SA1 konnte E4orf6 hingegen erst 24 h p. i. deutlich detektiert werden, jedoch waren die Gleichgewichtsmengen anschließend mit denen des Wildtypvirus vergleichbar. Deutlich erhöhte E4orf6-Mengen ergaben sich jedoch bei Infektion mit der Virusmutante 84R Δ C, bei der das Protein schon 8 h p. i. deutlich nachgewiesen werden konnte.

Es ist denkbar, dass die beobachteten Veränderungen in den E4orf6-Gleichgewichtsmengen die Ausbildung und Funktion des adenoviralen E3-Ubiquitin-Ligasekomplexes beeinflusst. Daher wurde im Folgenden überprüft ob sich die E1B-defizienten Virusmutanten hinsichtlich ihrer Fähigkeit zum Abbau zellulärer Zielproteine unterscheiden.

5.2.4.2 Gleichgewichtsmengen von p53

Das prominenteste Ziel des E1B-55K/E4orf6-vermittelten Proteinabbaus ist p53. Der Tumorsuppressor ist von zentraler Bedeutung für die Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose in Reaktion auf genotoxischen Stress oder virale Infektionen (Lane, 1992). Wird eine Zelle mit Adenoviren infiziert, die über einen funktionalen E1B-55K/E4orf6 E3-Ubiquitin-Ligasekomplex verfügt, kommt es zum Abbau von p53 (Blanchette *et al.*, 2004; Harada *et al.*, 2002; Querido *et al.*, 2001). Ist der Komplex hingegen defekt, wird der Tumorsuppressor stabilisiert und im Zellkern angereichert (Collot-Teixeira *et al.*, 2004; Grand *et al.*, 1994; Shen *et al.*, 2001). Um festzustellen, ob E1BN-Proteine diese Funktion beeinflussen oder sogar einen Verlust von E1B-55K kompensieren können, wurden die Gleichgewichtsmengen von p53 im Infektionsverlauf bestimmt (Abb. 5.9).

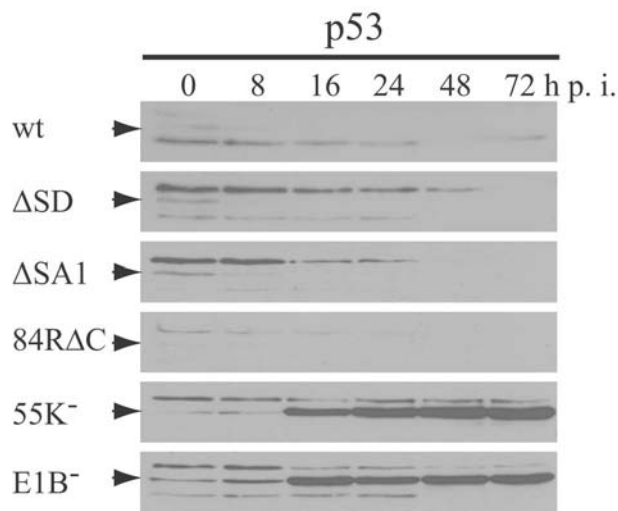


Abb. 5.9: p53-Gleichgewichtsmengen im Infektionsverlauf. A549-Zellen wurden mit *moi* 50 des Wildtypvirus (wt) bzw. der Virusmutanten Δ SD, Δ SA1, 84R Δ C, 55K⁻ oder E1B⁻ infiziert, nach 8, 16, 24, 48 bzw. 72 h geerntet und in NP-40-Lysepuffer aufgeschlossen. Nicht-infizierte Zellen („0“) dienten als Negativkontrolle. Je 100 μ g der so gewonnenen Lysate wurden auf einem 10% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und im *Western Blot* eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels des Primärantikörpers FL-393. Die Pfeile zeigen jeweils die zugehörige p53-Bande an.

Die Untersuchung infizierter A549-Zellen ergab, dass die Virusmutanten Δ SD, Δ SA1 und 84R Δ C ebenso effizient wie das Wildtypvirus eine Reduktion der p53-Gleichgewichtsmengen induzieren können. So konnte der Tumorsuppressor für keines dieser E1B-55K-exprimierenden Viren länger als 8 h nach Infektion nachgewiesen werden. Bei den E1B-55K-defizienten Viren 55K⁻ und E1B⁻ kam es hingegen ab 16 h p. i. zu einer deutlichen Zunahme der p53-Mengen. Oberhalb und unterhalb der p53-Bande wurde jeweils eine weitere Proteinbande detektiert, die jedoch nicht zugeordnet werden konnte.

5.2.4.3 Gleichgewichtsmengen von Mre11 und Rad50

Neben p53 sind insbesondere Komponenten der zelluläre Mre11/Rad50/NBS1-Komplex (MRN-Komplex) Ziel der E1B-55K/E4orf6-E3-Ubiquitin-Ligase (Mohammadi *et al.*, 2004; Stracker *et al.*, 2002). Nach einer aktuellen Modellvorstellung fungiert dieser Komplex als Sensor für DNA-Doppelstrangbrüche, er vermittelt so die zelluläre DNA-Schadensantwort und ist auch aktiv an der Reparatur der Schäden beteiligt (Hopfner *et al.*, 2002; Paull und Gellert, 1998; Petrini und Stracker, 2003; Shiloh, 2003; Trujillo *et al.*, 1998).

Nach Infektion humaner Zellen mit Ad5 Wildtypviren werden Mre11 und auch Rad50 E1B-55K/E4orf6-abhängig abgebaut (Stracker *et al.*, 2002). Um festzustellen, ob die E1BN-Proteine einen Einfluss auf den Abbau von Mre11 und Rad50 durch die Wirkung des E1B-55K/E4orf6-Ubiquitin-Ligasekomplexes haben, wurden die

Gleichgewichtsmengen der Proteine in infizierten Zellen im zeitlichen Verlauf der Infektion erfasst (Abb. 5.10).

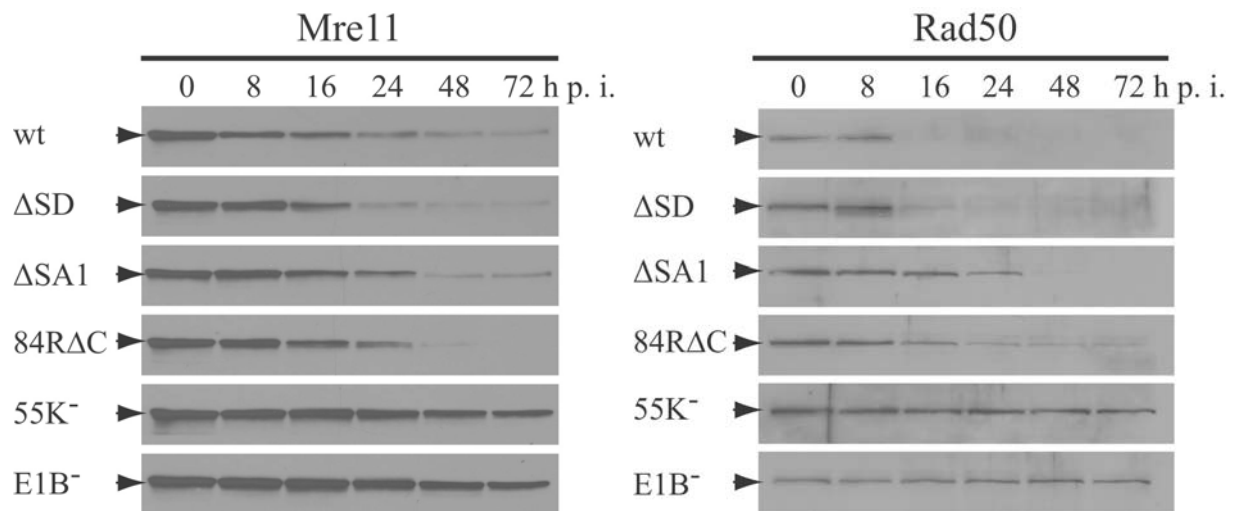


Abb. 5.10: Mre11 und Rad50 im Infektionsverlauf. A549-Zellen wurden mit *moi* 50 des Wildtypvirus (wt) bzw. der Virusmutanten Δ SD, Δ SA1, 84R Δ C, 55K⁻ oder E1B⁻ infiziert, nach 8, 16, 24, 48 bzw. 72 h geerntet und in NP-40-Lysepuffer aufgeschlossen. Nicht-infizierte Zellen („0“) dienten als Negativkontrolle. Je 100 μ g der so gewonnenen Lysate wurden auf einem 10% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und im *Western Blot* eingesetzt. Die Detektion von Mre11 (links) erfolgte unter Verwendung des Primärantikörpers ab397, die von Rad50 (rechts) unter Nutzung von ab499. Die Pfeile zeigen jeweils die zugehörigen Proteinbanden an.

In Zellen die mit dem Wildtypvirus infiziert wurden, wurde wie erwartet eine Abnahme der Mre11- und Rad50-Gleichgewichtsmengen beobachtet. Auch für die E1B-55K-exprimierenden Virusmutanten Δ SD, Δ SA1 und 84R Δ C konnte ein vergleichbarer Mre11-Abbau gezeigt werden. Im Abbau von Rad50 verhielten sich die Virusmutanten hingegen unterschiedlich. Während das Protein nach Δ SD-Infektion fast ebenso schnell abgebaut wurde wie durch das Wildtypvirus, war es in Δ SA1- und 84R Δ C-infizierten Zellen wesentlich länger nachweisbar.

Die E1B-55K-defizienten Viren waren, wie erwartet nicht in der Lage Mre11 oder Rad50 zu destabilisieren. Dabei wurde kein wesentlicher Unterschied zwischen 55K⁻ und E1B⁻ festgestellt, dass neben E1B-55K auch keine E1BN-Proteine mehr synthetisieren kann.

5.3 Expression der E1BN-Proteine außerhalb des viralen Kontexts

Nachdem durch die Verwendung von Virusmutanten erste Hinweise auf mögliche Funktionen der E1BN-Proteine gesammelt wurden, wurden für zukünftige, differenziertere Studien geeignete rekombinante Expressionsplasmide hergestellt.

Die Plasmide pE1B-156R, pE1B-93R und pE1B-84R enthalten dabei die aus revers transkribierten, gespleißten mRNAs isolierten, kodierenden Leserahmen der jeweiligen E1BN-Proteine (4.3.3). Zur Expression von E1B-55K wurde das Plasmid pE1B-55K verwendet (Nevels *et al.*, 2001). Da dieses Plasmid ein Fragment der Ad5 E1-Region enthält ist es potenziell auch zur Expression der E1BN-Proteine in der Lage. Um nun E1B-55K alleine exprimieren zu können wurde die Spleißdonorstelle SD1 wie in der Virusmutante Δ SD inaktiviert (5.1.1).

Zum Studium der E1BN-Proteine wurde ihre Expression und subzelluläre Lokalisation in transfizierten Zellen untersucht. Hierzu wurden H1299-Zellen mit den verschiedenen Plasmiden transfiziert und nach 24 h bzw. 48 h durch *Western Blot* oder Immunfluoreszenz eingesetzt (Abb. 5.11).

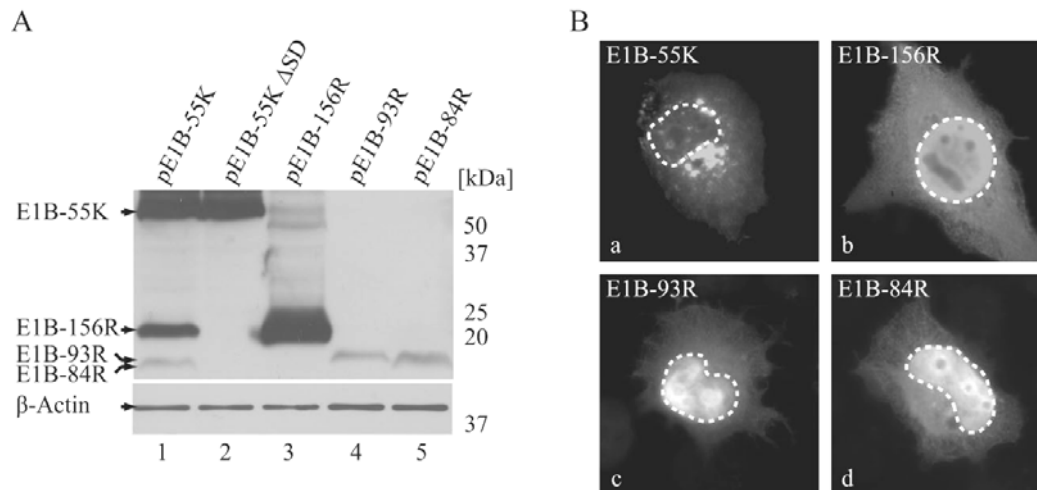


Abb. 5.11: Expression und subzelluläre Lokalisation der E1B-Proteine.

(A) 2×10^6 H1299-Zellen wurden mit den verschiedenen Konstrukten transfiziert (je $2 \mu\text{g}$; Liposomen-Methode) die E1B-55K (pE1B-55K und pE1B-55K Δ SD), E1B-156R (pE1B-156R), E1B-93R (pE1B-93R) und E1B-84R (pE1B-84R) exprimieren. Nach 48 h wurden die Zellen mit RIPA-Light Puffer lysiert, $120 \mu\text{g}$ Gesamtzelllysat über ein 15% SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot eingesetzt. Zum Nachweis wurde der 2A6 als Primärantikörper verwendet. Als Ladekontrolle wurde β -Actin (aus $20 \mu\text{g}$ Gesamtzelllysat; Antikörper AC-15) nachgewiesen. Rechts sind Größe und Position der Banden des Precision Protein Standards (BioRad) angegeben. (B) Die subzelluläre Verteilung der E1B-Proteine wurde in Immunfluoreszenz-Analysen untersucht. Hierzu wurden 2×10^5 H1299-Zellen mit $5 \mu\text{g}$ pE1B-55K Δ SD (a), pE1B-156R (b), pE1B-93R (c) bzw. pE1B-84R (d) nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Zur Visualisierung der Proteine wurden die Zellen 48 h nach Transfektion mit PFA fixiert (4.7.7). Die E1B-Proteine wurden mit Hilfe des Primärantikörpers 2A6 nachgewiesen. Die Ränder der Zellkerne sind mit gestrichelten Linien markiert.

Die Western Blot-Analyse zeigte (Abb. 5.11 A), eine Expression von E1B-55K (55 kDa), E1B-156R (20 kDa), E1B-93R (17 kDa) und E1B-84R (16 kDa) durch die jeweiligen Konstrukte. Hierbei wurden in pE1B-55K-transfizierten Zellen neben E1B-55K auch noch E1B-156R und E1B-93R/E1B-84R nachgewiesen (Abb. 5.11 A; Spur 1). Diese Beobachtung zeigt, dass die alternativen Spleißprozesse denen die E1B-Region im viralen Kontext unterliegt auch auf Ebene rekombinanter Plasmide stattfinden. Durch pE1B-55K Δ SD konnte E1B-55K hingegen unabhängig von E1B-156R, E1B-93R und E1B-84R exprimiert werden (Abb. 5.11 A; Spur 2).

Auffällig waren auch die deutlichen Unterschiede in den Gleichgewichtsmengen der Proteine. Während große Mengen E1B-55K und E1B-156R vorlagen, waren E1B-93R und E1B-84R kaum zu detektieren. Da die drei E1BN-Proteine aufgrund der analog

aufgebauten Konstrukte wohl vergleichbar stark exprimiert werden, geht dies wahrscheinlich auf eine niedrige Proteinstabilität von E1B-93R und E1B-84R zurück.

Bei der Untersuchung der subzellulären Lokalisation (Abb. 5.11 B; a) lies sich die bekannte Verteilung von E1B-55K (starke Färbung kernnaher Strukturen, sowie eine schwache diffuse Färbung in Zytoplasma und Kern) bestätigen (Maheswaran *et al.*, 1998; Zantema *et al.*, 1985). Die drei E1BN-Proteine zeigten alle eine sehr ähnliche Lokalisation und lagen diffus in der Zelle verteilt vor, wobei die Färbung im kernnahen Zytoplasma und im Kern am intensivsten war (Abb. 5.11 B; b-d).

In den im Folgenden beschriebenen Studien wurde E1B-156R untersucht, da es bereits Hinweise auf mögliche Funktionen des Proteins gab.

5.4 Identifizierung der Funktionen von E1B-156R

Von den drei E1BN-Proteinen zeigt E1B-156R die größte Ähnlichkeit zu E1B-55K, da sich die Aminosäuresequenz von E1B-156R aus den 79 N-terminalen und den 77 C-terminalen Aminosäuren von E1B-55K zusammensetzt (Abb. 2.5). Im Gegensatz zum N-Terminus, dem bisher keine eindeutige Funktion zugeordnet werden konnte, enthält der C-Terminus von E1B-55K eine Transkriptionsrepressionsdomäne (Martin und Berk, 1998; Martin und Berk, 1999; Teodoro und Branton, 1997; Teodoro *et al.*, 1994; Yew und Berk, 1992; Yew *et al.*, 1994). Es wurde gezeigt, dass E1B-55K durch diese Domäne die p53-vermittelte Transaktivierung reprimieren kann und dass diese Aktivität von großer Bedeutung für das transformationsfördernde Potenzial des E1B-Proteins ist (Teodoro und Branton, 1997; Teodoro *et al.*, 1994; Yew und Berk, 1992; Yew *et al.*, 1994). Nachdem E1B-156R ebenfalls diesen Bereich enthält, ist es denkbar, dass es auch ähnliche Funktionen besitzen könnte. Der Großteil der im Folgenden vorgestellten Daten wurden von uns bereits 2007 im *Journal of Virology* veröffentlicht (Sieber und Dobner, 2007).

5.4.1 E1B-156R besitzt transformationsförderndes Potenzial

Um zu überprüfen ob E1B-156R, wie E1B-55K, die Transformation primärer Nagerzellen in Kooperation mit Ad5 E1A fördern kann, wurden Transformationsversuche (4.6.2) mit primären Rattennierenzellen (Nevels *et al.*, 1997) durchgeführt. Hierzu wurden primäre BRK-Zellen mit E1A- oder mit E1A- und E1B-55K- bzw. E1B-156R-exprimierenden Plasmiden transfiziert. Innerhalb der nächsten Wochen starb ein Großteil der Zellen ab, während einige wenige durch die Wirkung der viralen Proteine immortalisiert bzw. transformiert wurden und Zellkolonien (*Foci*) ausbildeten (Abb. 5.12).

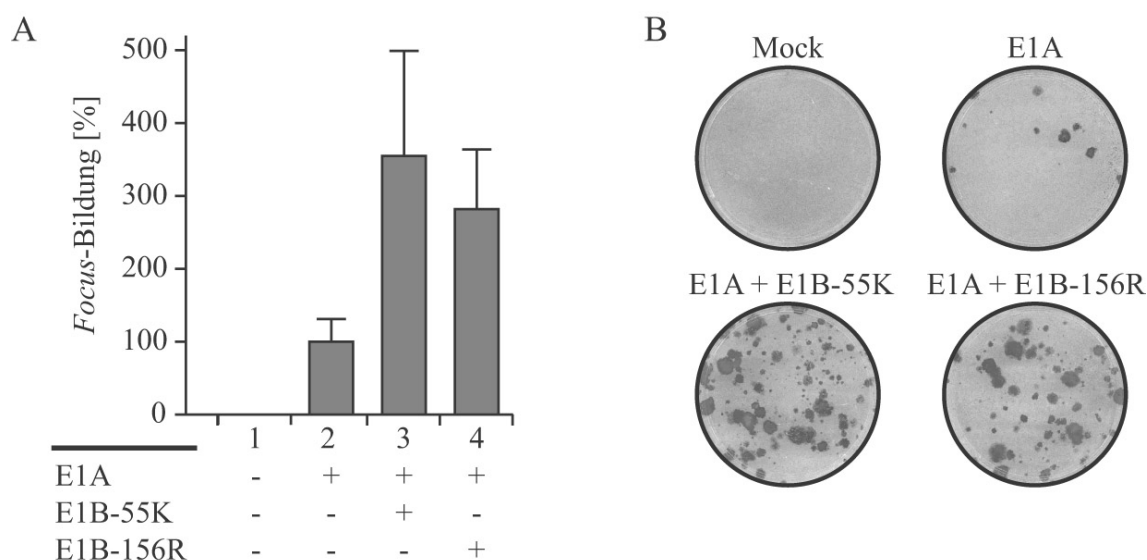


Abb. 5.12: E1B-156R kooperiert mit E1A in der Transformation primärer Nagerzellen. (A) Primäre BRK-Zellen wurden entsprechend der angegebenen Tabelle mit E1A- (1,5 µg pCMV-E1A 12S), E1B-55K- (3 µg pE1B-55K) und E1B-156R- (3 µg pE1B-156R) kodierenden Plasmiden nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert (4.4.3.1). Ein „+“ kennzeichnet dabei die Transfektion des jeweiligen Konstruktes im Ansatz. Fünf Wochen nach Transfektion wurde die Anzahl morphologisch transformierter Kolonien (*Foci*) bestimmt. Die *Focus*-Bildung ist hier relativ zur Zahl der *Foci* bei pCMV-E1A 12S Transfektion angegeben. Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten angegeben. Die mittlere *Focus*-Zahl bei pCMV-E1A 12S war 4. Unter (B) sind exemplarisch Kristallviolett-gefärbte Schalen der verschiedenen Ansätze dargestellt (4.6.2).

Durch alleinigen E1A-Transfektion wuchsen nur sehr wenige Zellklone (*Foci*) aus (Abb. 5.12; A & B). Die Koexpression von E1A und E1B-55K resultierte hingegen in einer drei- bis viermal stärkeren Induktion von dichten, schnell-wachsenden *Foci*. Auch E1B-156R konnte, ähnlich wie E1B-55K, die Transformationsrate von E1A signifikant auf fast das dreifache erhöhen. E1A/E1B-156R-induzierte *Foci* konnten

außerdem erfolgreich zu stabilen Zelllinien expandiert werden (4.1.2). Diese Daten zeigen, dass E1B-156R, ähnlich wie E1B-55K, transformationsförderndes Potenzial besitzt. Somit konnte zum ersten Mal einem E1BN-Protein eine Funktion zugeordnet werden.

5.4.2 Charakterisierung E1A/E1B-156R-transformierter Zellen

Um beurteilen zu können, welchen Einfluss E1B-156R auf den Phänotyp der transformierten Zellen hat, wurden drei E1A/E1B-156R-transformierte Zelllinien (AB605, AB606 und AB629) mit primären BRKs, A4 (exprimieren Ad5 E1A; Sieber und Dobner, 2007), AB7 (exprimieren die Ad5 E1-Proteine; Nevels *et al.*, 1999) sowie AB120 (exprimieren Ad5 E1A & E1B-55K; Endter *et al.*, 2001) verglichen (Abb. 5.13).

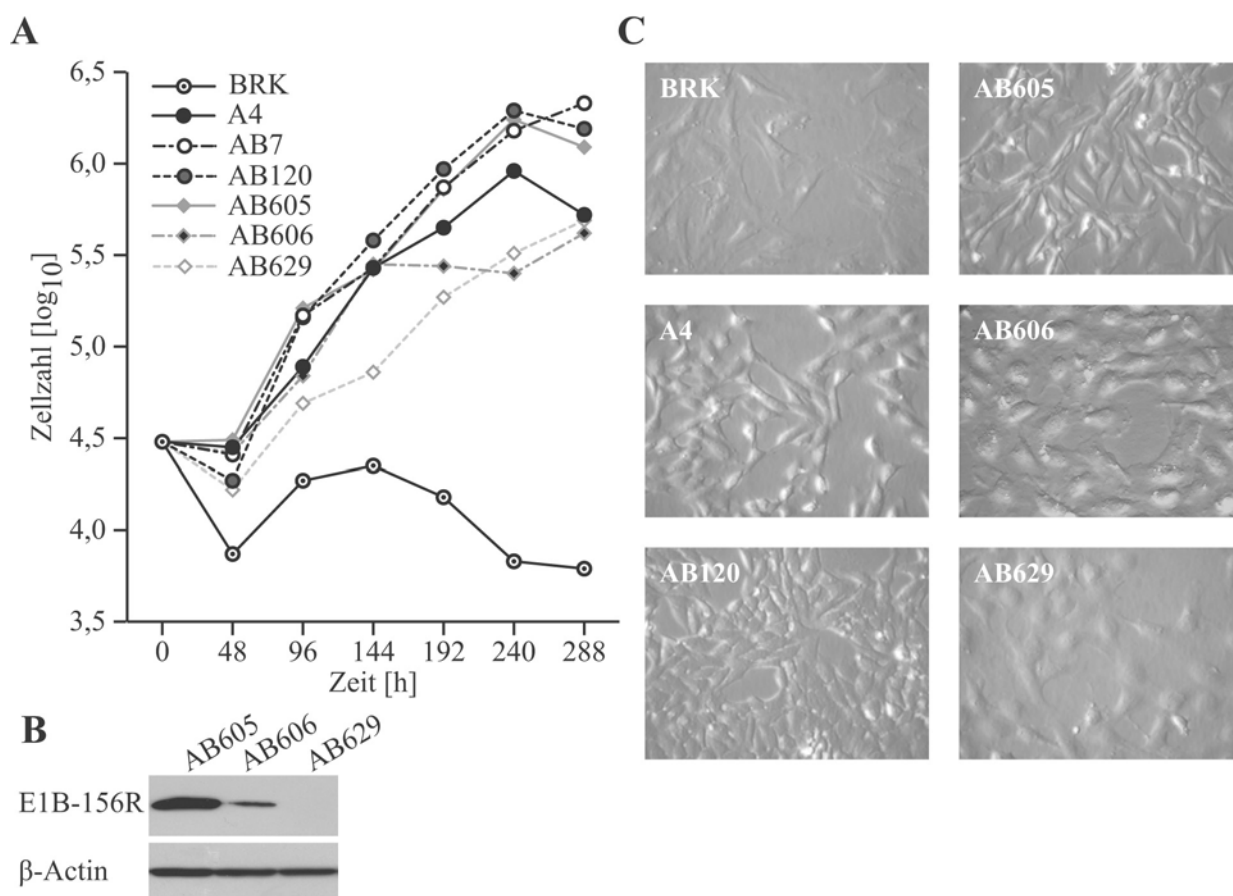


Abb. 5.13: Wachstumscharakteristika E1A/E1B-156R transformierter Zellen. (A) Es wurden E1A/E1B-156R transformierte Zelllinien (AB605, AB606 und AB629) mit primären BRK-Zellen sowie den Referenz-Zelllinien A4 (E1A), AB120 (E1A und E1B-55K) oder AB7 (alle Proteine der E1-Region) verglichen. Je 3×10^4 der jeweiligen Zellen sowie primäre BRK-Zellen wurden in 6-well-Vertiefungen ausgesät und in Medium mit 5% FKS inkubiert. Zur Doppelbestimmung wurden je zwei 6-well-Vertiefungen pro Zeitpunkt und Zelllinie angelegt. Die Zellzahl wurde über einen Zeitraum von 288 h alle 48 h bestimmt. (B) Zum

Nachweis von E1B-156R wurden AB605-, AB606- und AB629-Zellen mit RIPA-*Light* lysiert, 80 µg Gesamtzelllysate über ein 12% SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und im *Western Blot* eingesetzt. Zum Nachweis wurde 7C11 als Primärantikörper verwendet. Als Ladekontrolle wurde β -Actin (aus 25 µg Gesamtzelllysate; Antikörper AC-15) nachgewiesen. (C) Subkonfluente BRK-, A4-, AB120-, AB605-, AB606- und AB629-Kulturen wurden mit einem inversen Lichtmikroskop (Leica DM IL) im Phasenkontrast dargestellt.

Hierbei zeigte sich, dass die AB605-, AB606- und AB629-Zellen ähnliche Wachstumsraten und Sättigungszellichten aufwiesen, wie die Kontrollzelllinien (AB7, AB120 und A4) und sich damit deutlich von den nicht-transformierten Vorläuferzellen (primäre BRK) unterschieden (Abb. 5.13 A). Wie *Western Blot*-Analysen zeigten, ist die E1B-156R-Expression in den drei durch E1A- und E1B-156R-Transfektion gewonnenen Zelllinien verschieden stark (Abb. 5.13 B). Während in AB605-Zellen moderate E1B-156R-Mengen nachgewiesen werden konnten, war das Protein in AB606 kaum und in AB629 gar nicht nachweisbar. Die E1B-156R-Expression scheint mit der Wachstumsrate und der erreichbaren Sättigungszellichte zu korrelieren. Das Wachstumsverhalten der moderat E1B-156R-exprimierenden AB605-Zellen war mit dem starken Wachstum von AB7 und AB120 vergleichbar. AB606 und AB629 wuchsen hingegen langsamer und zu deutlich niedrigeren Sättigungsdichten und waren damit eher mit den A4-Zellen zu vergleichen die nur E1A exprimieren. Auch die Morphologie der E1A/E1B-156R-transformierten Zellen unterschied sich deutlich von der primärer BRK-Zellen, die größer und gestreckter erschienen (Abb. 5.13 C).

5.4.3 Hinweise auf „Hit & Run“-Transformation durch E1A und E1B-156R

Auffällig bei der Untersuchung der E1A/E1B-156R-transformierten Zelllinien AB605, AB606 und AB629 war, dass E1A und im Fall von AB629 auch E1B-156R nicht nachweisbar waren. Ursache hierfür könnte eine sehr schwache Expression der Proteine oder auch der Verlust der Gene sein. Um eine bessere Übersicht über die vorliegenden Verhältnisse zu bekommen, wurden insgesamt zehn E1A/E1B-156R-transformierte Zelllinien (AB605, AB606, AB627-AB629, AB632, AB634, AB635, AB637 und AB638) auf E1A- und E1B-156R-Expression, sowie auf Integration viraler DNA-Sequenzen hin untersucht. Daneben wurde auch untersucht, ob in diesen Zellen eine Stabilisierung von p53 beobachtet werden kann, die mit der in E1A/E1B-

55K-transformierten Zellen vergleichbar ist. Zum Nachweis viraler Sequenzen im zellulären Genom wurden PCR-Analysen durchgeführt (Abb. 5.14 A). Der Nachweis der Proteine erfolgte durch *Western Blot*-Analysen (Abb. 5.14 B).

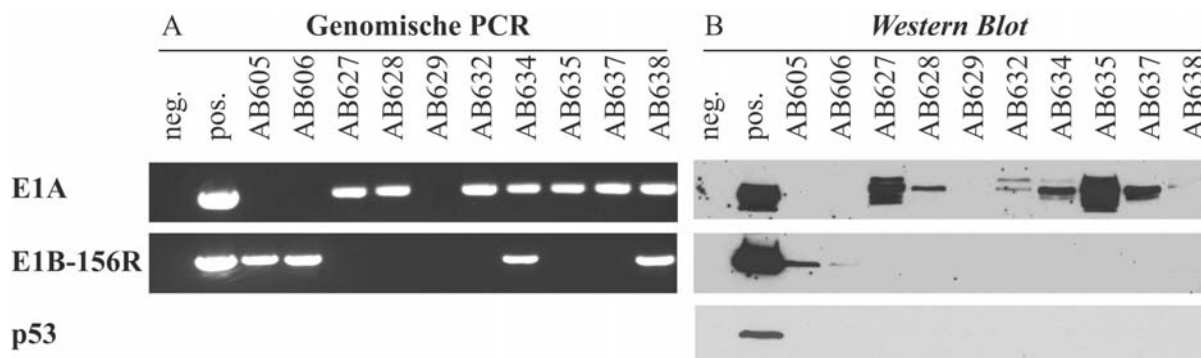


Abb. 5.14: Nachweis von E1A, E1B-156R und p53 in transformierten Zellen. Die mittels E1A- und E1B-156R-kodierender Plasmide transformierten Zelllinien (AB605, AB606, AB627-AB629, AB632, AB634, AB635, AB637 und AB638) wurden auf DNA-Integration und Expression der viralen Proteine untersucht. (A) Der Nachweis viraler Sequenzen im zellulären Genom erfolgte durch PCR (30 Zyklen; 0,5 µg genomische DNA). Es wurden die Oligonukleotide E1Bmt(BamHI)fwd und E1Bmt(EcoRI)rev bzw. E1A_{bp} 626 fwd und E1A_gPCRrev benutzt. Als Negativkontrolle diente genomische DNA nicht transfizierter Zellen (neg.). Als Positivkontrolle wurde geeignete Plasmid-DNA (E1A: 12,5 ng pCMV-E1A 12S; E1B-156R: 10 ng pE1B-156R) genutzt (pos.). (B) Die Expression von E1A, E1B-156R und p53 wurde im *Western Blot* überprüft. Hierbei wurden je 50 (E1A) bzw. 75 µg (E1B-156R & p53) Gesamtzelllysat (Lyse in RIPA-Light) elektrophoretisch über 12% SDS-PAGE-Gele aufgetrennt und die gesuchten Proteine anschließend mittels der spezifischen Primärantikörper M73 (E1A), 7C11 (E1B-156R) und FL-393 (p53) im *Western Blot* detektiert. Als Negativkontrolle wurden jeweils BRK1-Zellen (neg.) verwendet. Als Positivkontrolle dienten BRK1-Zellen die mit geeigneten Plasmiden (E1A: pCMV-E1A 12S bzw. E1B-156R: pE1B-156R) transient transfiziert wurden. Als Positivkontrolle für erhöhte p53-Gleichgewichtsmengen diente AB120-Zelllysat.

In den Untersuchungen war nicht in allen durch E1A/E1B-156R gewonnenen Zelllinien, virales Material nachweisbar was sie von E1A/E1B-55K-transformierten Zellen (Graham *et al.*, 1977; Hutton *et al.*, 2000; Zantema *et al.*, 1985) unterscheidet. So war nur in 70% der Zelllinien E1A-kodierende DNA sowie E1A-Expression nachweisbar. Die für E1B-156R kodierende DNA konnte in vier der zehn Zelllinien gezeigt werden, eine Proteinexpression nur in Zweien (AB605 & AB606).

Diese Beobachtung steht daher im Widerspruch zum klassischen Modell der viralen Transformation, das eine dauerhafte Expression der viralen Proteine fordert und deutet auf eine Transformation nach dem „Hit & Run“-Modell hin (2.2.1.2).

Die Untersuchung der p53-Gleichgewichtsmengen (Abb. 5.14 B) weist ebenfalls auf einen Unterschied zwischen der Transformationsförderung durch E1B-55K und durch E1B-156R hin. Während der Tumorsuppressor in AB120 und anderen E1A/E1B-55K-transformierten Zellen (Grand *et al.*, 1995; Lowe und Ruley, 1993; Sarnow *et al.*, 1982; Zantema *et al.*, 1985) in deutlich erhöhten Konzentrationen vorliegt, konnte in den E1A/E1B-156R-transformierten Zelllinien keine erhöhte p53-Menge detektiert werden (Abb. 5.14 B).

Nachdem die gewonnenen Daten auf eine „Hit & Run“-Transformation hinweisen und vermutet wird, dass ein solcher Mechanismus durch mutagen-wirkende Proteine ausgelöst werden kann, wurde untersucht ob E1B-156R genomische Instabilität induzieren/verstärken kann. Um dies zu bestimmen wurden die Chromosomensätze E1A/E1B-156R-transformierter Zellen analysiert (4.4.5). Hierzu wurden durch Behandlung mit dem Mitosehemmer Colchizin primäre und Ad5-transformierte BRK-Zellen in der Metaphase angereichert. Anschließend wurden die Metaphasenchromosomen isoliert und die Anzahl der Chromosomen pro Zelle bestimmt (Abb. 5.15).

Zelllinie	semi-diploid	aneuploid	semi-tetraploid
BRK	79%	21%	0%
A4	56%	44%	0%
AB120	0%	92%	8%
AB605	40%	40%	20%
AB606	30%	20%	50%
AB629	9%	91%	0%
AB634	36%	64%	0%

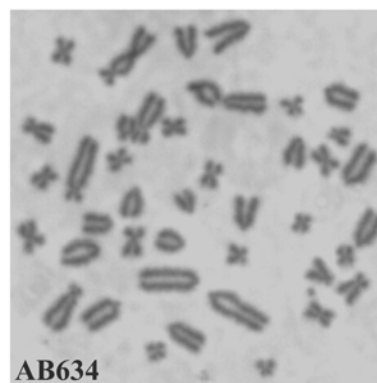


Abb. 5.15: Chromosomenverteilungen in Adenovirus-transformierten Zellen. Zur Bestimmung der Chromosomenzahlen wurden Metaphasenchromosomen-Präparationen (4.4.5) primärer BRK-Zellen (BRK) sowie E1A- (A4), E1A/E1B-55K- (AB120) bzw. E1A & E1B-156R- (AB605, AB606, AB629 und AB634) transformierter Zelllinien angefertigt. Um die Verteilung der Chromosomensätze innerhalb einzelner Zelllinien zu erfassen, wurden drei verschiedene Klassen definiert. Zellen mit 37-45 Chromosomen wurden als „semi-diploid“, solche mit 80-88 als „semi-tetraploid“ und alle anderen als „aneuploid“ klassifiziert. Rechts ist exemplarisch ein Metaphasenchromosomen-Präparat (AB634) dargestellt. Es wurden jeweils ≥ 10 Kerne ausgezählt.

Hierbei konnte für 79% der primären BRK-Zellen ein diploides (42 Chromosomen) bzw. semi-diploides [37-45 Chromosomen] Genom gezeigt werden (Abb. 5.15). Der Anteil semi-diploider Zellen war in der mit E1A immortalisierten/transformierten Zelllinie A4 auf 56% reduziert. Stattdessen wurden hier vermehrt aneuploide Zellen beobachtet (44%). Wurden die Zellen durch Transfektion mit E1A- und E1B-156R-Expressionskonstrukten gewonnen, war der semi-diploide Anteil sogar noch geringer (9-40%). Bei zwei der E1A/E1B-156R-transformierten Zelllinien (AB605 und AB606) wurden im Gegensatz zu BRK und A4, außerdem semi-tetraploide Zellen beobachtet (20 bzw. 50%). Auch in der E1A/E1B-55K-transformierten Zelllinie AB120, wurden semi-tetraploide Zellen beobachtet (8%) wobei hier die Mehrheit der Zellen aneuploid zu sein schien (92%).

Die Untersuchung der verschiedenen transformierten Zelllinien lässt nur indirekte Rückschlüsse auf das mutagene Potenzial der an der Transformation beteiligten Proteine zu. Die Ergebnisse bestätigen jedoch, dass E1A genetische Instabilität induzieren kann (De Luca *et al.*, 2003; Drews *et al.*, 1992) und weisen darauf hin, dass E1B-156R und auch E1B-55K eine weitere Destabilisierung des Genoms verursachen können.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Daten zeigen, dass E1B-156R in Kooperation mit E1A eine Transformation induziert, die dem „Hit & Run“-Modell der viralen Onkogenese zu folgen scheint. Darüber hinaus konnten Hinweise für eine Induktion oder Verstärkung genomischer Instabilität durch E1B-156R gefunden werden. Im Folgenden sollte untersucht werden, welche molekularen Mechanismen E1B-156R nutzt um die zelluläre Transformation zu fördern. Da E1B-156R eine Isoform von E1B-55K darstellt, wurden insbesondere Wechselwirkungen und Mechanismen untersucht, für die bereits bekannt ist, dass sie zum transformierenden Potenzial des Vollängenproteins beitragen.

5.4.4 E1B-156R interagiert mit p53

Es wurde vermutet, dass die Transformationsförderung durch E1B-55K hauptsächlich von der Fähigkeit des Proteins abhängt, die Aktivitäten von p53 zu inhibieren (Endter *et al.*, 2005; Hutton *et al.*, 2000; Martin und Berk, 1998; Teodoro

und Branton, 1997; Teodoro *et al.*, 1994; Yew und Berk, 1992; Yew *et al.*, 1994). Eine wichtige Voraussetzung hierfür ist seine Fähigkeit zur Bindung des Tumorsuppressors (Martin und Berk, 1999; Steegenga *et al.*, 1999). Um zu überprüfen ob die transformationsfördernde Wirkung von E1B-156R ebenfalls durch Inhibition von p53 vermittelt wird wurde zuerst untersucht, ob es mit dem Tumorsuppressor interagieren kann.

Hierzu wurden Koimmunpräzipitations-Versuche mit H1299-Zellen durchgeführt die p53, E1B-55K und E1B-156R transient exprimierten. Dabei wurde versucht p53 zusammen mit E1B-55K bzw. E1B-156R durch den E1B-spezifischen Antikörper 2A6 zu präzipitieren (Abb. 5.16).

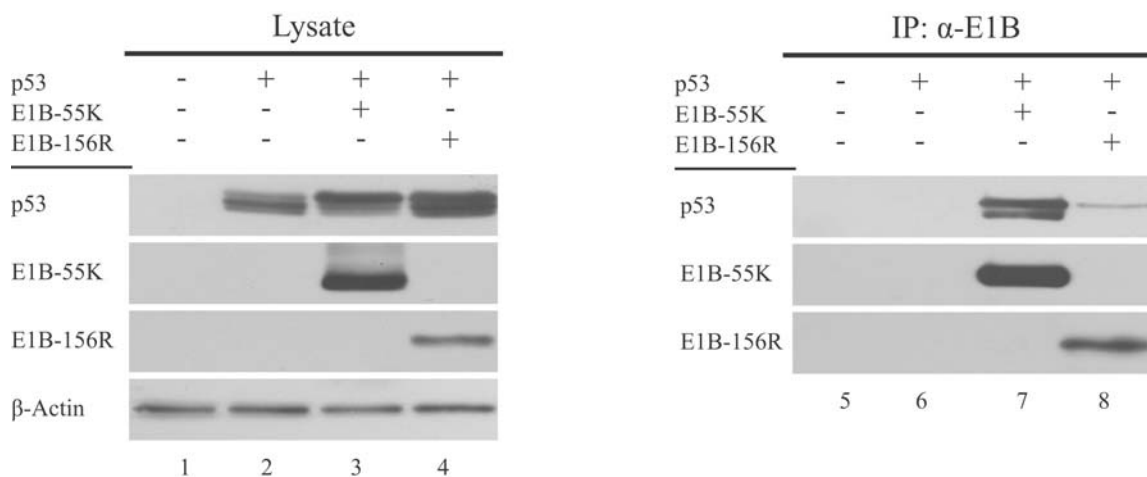


Abb. 5.16: E1B-156R interagiert mit p53. 7×10^6 subkonfluent gewachsene H1299-Zellen wurden entsprechend der angegebenen Tabelle (Plasmidzugabe je mit „+“ gekennzeichnet) nach der Liposomen-Methode mit p53- (3 μ g pC53-SN3), E1B-55K- (7 μ g pE1B-55K) und E1B-156R-kodierenden (7 μ g pE1B-156R) Plasmiden transfiziert. Um Promotor-Interferenzen vorzubeugen wurden alle Ansätze mit pcDNA3 auf gleiche CMV-Promotormengen aufgefüllt. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und mit RIPA-Light (4.7.5) aufgeschlossen. In der Immunpräzipitation wurden aus jeweils 750 μ g Gesamtzelllysate mittels des Antikörpers 2A6, E1B-55K und E1B-156R direkt präzipitiert. Zur Kopräzipitation von p53 wurde derselbe Antikörper und 1,5 mg Lysat verwendet. Anschließend wurden die Gesamtzelllysate (je 50 μ g Gesamtprotein für E1B-Proteine und p53; Spuren 1-4) und die Immunpräzipitationen (Spuren 5-8) über 12% SDS-PAGE-Gele elektrophoretisch aufgetrennt und im *Western Blot* eingesetzt. Zur Detektion der exprimierten E1B-Proteine wurde der Primärantikörper 7C11 verwendet. p53 wurde mittels DO-1 (Spuren 1-4) bzw. FL-393 (Spuren 5-8) nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente β -Actin (aus 50 μ g Gesamtprotein; detektiert mittels AC-15).

p53 wurde in den *Western Blot*-Analysen der gewonnenen Lysate in mindestens zwei dicht beieinander liegenden Banden detektiert, die wahrscheinlich unterschiedlich

modifizierte Formen des Tumorsuppressors darstellen (Abb. 5.16; Spuren 2-4). Durch Immunpräzipitation der E1B-Proteine mit dem Primärantikörper 2A6 war es sowohl für E1B-55K als auch für E1B-156R möglich p53 zu kopräzipitieren (Abb. 5.16; Spuren 7 & 8). In Proben ohne E1B-Proteine konnte kein p53 präzipitiert werden (Abb. 5.16; Spuren 5 & 6).

Während E1B-55K mit zwei verschiedenen p53-Formen interagiert, konnte für E1B-156R nur eine schwache Interaktion mit der höher laufenden Form gezeigt werden. Zwar kann nicht ausgeschlossen werden, dass E1B-156R auch mit der schneller laufenden Form interagiert, jedoch scheint diese Interaktion deutlich reduziert zu sein.

Nachdem somit eine schwache Interaktion zwischen p53 und E1B-156R gezeigt wurde, sollte im Folgenden untersucht werden ob E1B-156R, ebenso wie E1B-55K, den Tumorsuppressor im Zytoplasma sequestrieren kann. Da auch diese Funktion bereits mit dem transformationsfördernden Potenzial von E1B-55K in Verbindung gebracht wurde (Endter *et al.*, 2005; Hutton *et al.*, 2000).

Hierzu wurden subkonfluente H1299-Zellen mit Plasmiden für die Expression von p53, E1B-156R und E1B-55K transfiziert und anschließend durch indirekte Immunfluoreszenz untersucht. Die Verteilungen der Proteine wurde durch den Vergleich von >100 Zellen für jede Probe bestimmt (Abb. 5.17).

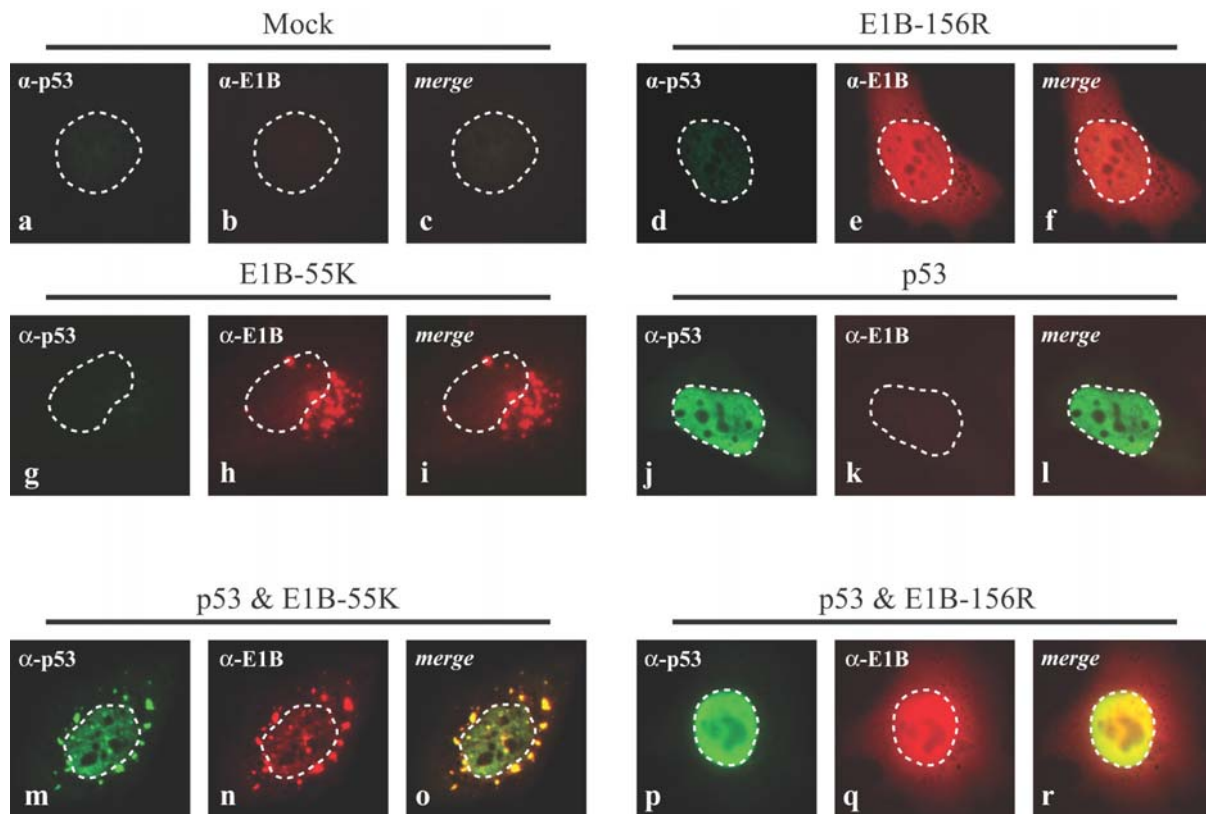


Abb. 5.17: E1B-156R beeinflusst die Lokalisation von p53 nicht. $2,5 \times 10^6$ subkonfluent gewachsene H1299-Zellen wurden mit Plasmiden zur p53- (1 μ g pC53-SN3), E1B-55K- (1 μ g pE1B-55K Δ SD) oder E1B-156R-Expression (1 μ g pE1B-156R) bzw. mit Kombinationen dieser Plasmide (p53 & E1B-55K bzw. p53 & E1B-156R) nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. 48 h p.i. wurden die Zellen geerntet, mit PFA fixiert (4.7.7) und in der Immunfluoreszenz untersucht. Die Zellen wurden *in situ* mit dem p53-spezifischen Antikörper FL-393 (α -p53) und dem E1B-spezifischen 2A6 (α -E1B) doppelmarkiert. Zur Detektion der Primärantikörper wurden FITC- (für p53) beziehungsweise TexasRed-markierte (für E1B) Sekundärantikörper verwendet. Dargestellt ist jeweils die Färbung von α -p53 (grün; a, d, g, j, m und p), α -E1B (rot; b, e, h, k, n und q) sowie eine Überlagerung beider Färbungen (*merge*; c, f, i, l, o und r). Die Bilder a-c wurden durch Färbung nicht transfizierter Zellen („Mock“) gewonnen und zeigen die Stärke der unspezifischen Hintergrundfärbung. Die Positionen der Zellkerne wurden durch eine gestrichelte Umrandung visualisiert.

E1B-156R liegt nach Transfektion in H1299 in allen untersuchten Zellen diffus im Zytoplasma und Zellkern verteilt vor, wobei es im und um den Nukleus angereichert zu sein scheint (Abb. 5.17; d-f). E1B-55K zeigt in 95% der Zellen eine schwache diffuse Färbung und eine starke Konzentration in kernnahen Strukturen (Abb. 5.17; g-i). Das in diesem Versuch eingesetzte Konstrukt pE1B-55K Δ SD kann aufgrund der eingeführten Spleißstellen-Mutation keine E1BN-Proteine bilden, so dass allein E1B-55K detektiert werden sollte. Die beobachtete Verteilung entspricht der, die bereits für spleißkompetente E1B-55K-Konstrukte beschrieben wurde (Zantema *et al.*, 1985).

p53 war im Allgemeinen diffus im Zellkern verteilt (Abb. 5.17; j-l), in etwa 13% der Zellen konnte daneben auch eine schwache, diffuse zytoplasmatische Färbung beobachtet werden. Wurden E1B-55K und p53 gemeinsam exprimiert, wurde stets ein großer Teil des p53 mit E1B-55K in den zytoplasmatischen Strukturen sequestriert (Abb. 5.17; m-o), was publizierte Beobachtungen bestätigt (Zantema *et al.*, 1985). Im Gegensatz dazu war für p53 und E1B-156R keine gegenseitige Beeinflussung der Lokalisation nachweisbar (Abb. 5.17; p-r). Somit wird die transformationsfördernde Wirkung von E1B-156R vermutlich nicht durch eine Relokalisation des Tumorsuppressors vermittelt.

5.4.5 E1B-156R kann die p53-vermittelte Transaktivierung nicht reprimieren

Die Repression der transaktivierenden Wirkung von p53 gilt als maßgeblicher Faktor der transformationsfördernden Wirkung von E1B-55K (Yew und Berk, 1992; Yew *et al.*, 1994). Da E1B-156R den C-Terminus von E1B-55K enthält und hier die Transkriptionsrepressionsdomäne des Volllängenproteins lokalisiert ist, wurde untersucht, ob es ebenfalls die p53-vermittelte Transaktivierung inhibieren kann.

Hierzu wurde der Einfluss der E1B-Proteine auf p53-regulierte Reporter-Konstrukte in Transkriptions-Reporter-Versuchen überprüft. Es wurden zwei *Firefly*-Luziferase exprimierende Konstrukte mit unterschiedlichen p53-abhängigen Promotoren verwendet. Zum einen ein Promotor mit Sequenzen aus dem zellulären Cyclin G-Promoter und zum anderen ein artifizieller Promotor mit fünf p53-Bindestellen. Eine Beeinflussung der transaktivierenden Wirkung von p53 durch die E1B-Proteine äußert sich hierbei in einer veränderten Luziferase-Expression, die luminometrisch bestimmt werden kann (Abb. 5.18).

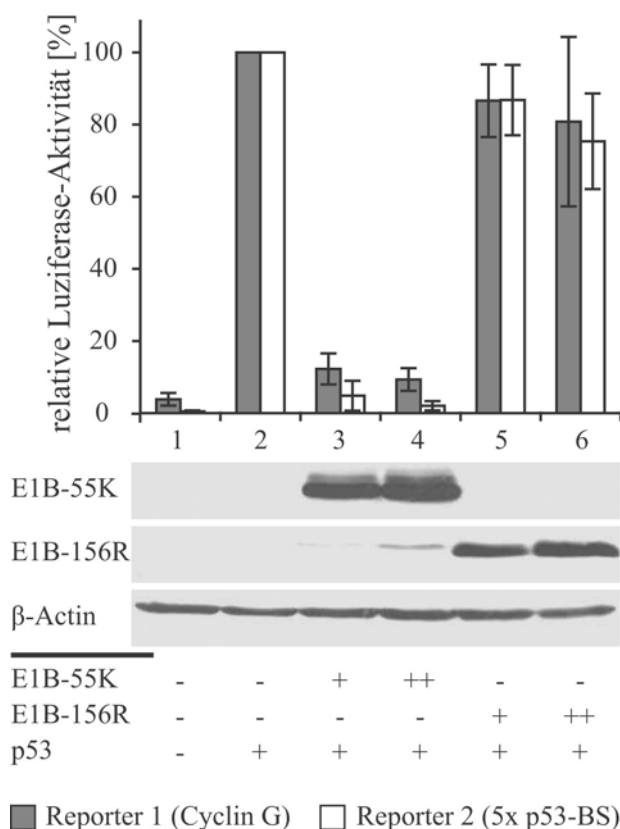


Abb. 5.18: E1B-156R kann die p53-vermittelte Transaktivierung nicht reprimieren. Zur Durchführung der Transkriptions-Reporter-Versuche wurden 2×10^5 H1299-Zellen mit einem p53-induzierbaren *Firefly*-Luziferase-Reporter (1 μg) sowie einem konstitutiv Renilla-Luziferase exprimierenden Plasmid (pRL-TK; 1 μg) als interne Kontrolle mit der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Hierbei kamen zwei unterschiedliche p53-induzierbare Reporter zum Einsatz: 1. pHH0.34-TK-Luc (1 μg), mit Sequenzen des zellulären Cyclin G-Promotors (graue Balken) und 2. pRE-Luc (1 μg), dessen Promotor fünf artifizielle p53-Bindestellen (5x p53-BS) enthält (weiße Balken). Entsprechend der angegebenen Tabelle wurde außerdem 1 („+“) oder 2 μg („++“) der E1B-Protein-kodierenden Plasmide pE1B-55K bzw. pE1B-156R sowie 0,025 μg des p53-Expressionskonstrukts pC53-SN3 transfiziert. Zum Ausgleich möglicher Promotor-Interferenzen wurden die Ansätze mit pcDNA3 auf gleiche CMV-Promotormengen aufgefüllt. 48h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und die Ansätze halbiert. Die eine Hälfte der Zellen wurde im *Dual-Luciferase® Reporter Assay* (4.8) eingesetzt. Die Luziferase-Aktivitäten wurden relativ zur p53-stimulierten Probe (Säulenpaar 2) angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Versuchen. Die andere Hälfte der Zellen wurde zur Kontrolle der E1B-Gleichgewichtsmengen mit RIPA-Lysate lysiert. Je 20 μg Gesamtzelllysate wurden mit einem 12% SDS-PAGE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und in *Western Blot*-Analysen mit dem E1B-spezifischen Primärantikörper 2A6 eingesetzt. Als Ladekontrolle diente β -Actin (aus 20 μg Gesamtzelllysate; detektiert mittels AC-15).

Beide Reporter-Konstrukte verhielten sich in den durchgeführten Experimenten sehr ähnlich und weisen in H1299-Zellen nur eine geringe basale *Firefly*-Luziferase-Aktivität auf, die durch p53-Expression stark erhöht wird (Abb. 5.18; Säulenpaare 1 & 2). Durch Koexpression steigender E1B-55K-Mengen kann diese Aktivierung

nahezu vollständig aufgehoben werden (Abb. 5.18; Säulenpaare 3 & 4). Die Transfektion derselben Mengen E1B-156R-kodierender Plasmids hat hingegen keinen deutlichen Einfluss auf die p53-vermittelte Transaktivierung (Abb. 5.18; Säulenpaare 5 & 6). Um auszuschließen, dass die Inaktivität von E1B-156R auf mangelnde Proteinexpression zurückzuführen ist, wurden *Western Blot*-Analysen durchgeführt, die eine vergleichbare Gleichgewichtsmenge beider E1B-Proteine bestätigten (Abb. 5.18; Spuren 3 & 4 bzw. 5 & 6). Um die Vergleichbarkeit mit veröffentlichten Ergebnissen zu erhalten, wurde in den Transkriptions-Reporter-Versuchen das spleißkompetente pE1B-55K anstelle des pE1B-55K Δ SD Konstruktes verwendet (Martin und Berk, 1998; Martin und Berk, 1999). Daher konnte in den Spuren 3 und 4 auch schwach E1B-156R detektiert werden.

Diese Daten zeigen, dass die transformationsfördernde Wirkung von E1B-156R auch unabhängig von der Repression der p53-vermittelten Transaktivierung ist.

5.4.6 E1B-156R besitzt eine funktionale Transkriptionsrepressionsdomäne

Da E1B-156R im Gegensatz zu E1B-55K nicht die transaktivierende Wirkung von p53 hemmen kann (5.4.5), stellt sich die Frage, ob die C-terminale Transkriptionsrepressionsdomäne von E1B-55K, im Kontext des E1B-156R-Proteins aktiv ist. Es wurde gezeigt, dass die E1B-55K-Transkriptionsrepressionsdomäne intrinsische Repressionsaktivität besitzt und nicht auf die Repression der p53-stimulierten Transkription beschränkt ist (Yew *et al.*, 1994). Daher ist denkbar, dass E1B-156R obwohl es die p53-vermittelte Transaktivierung nicht beeinflussen kann, dennoch eine funktionale Transkriptionsrepressionsdomäne besitzt.

Um dies zu überprüfen, wurden Transkriptions-Reporter-Versuche (4.8) durchgeführt. Hierzu wurden Fusionsproteine aus E1B-156R bzw. E1B-55K und einer aminoterminalen Gal4-DNA-Bindedomäne (Gal4-DB) zusammen mit einem Reporterkonstrukt in H1299 exprimiert. Als Reporter diente ein *Firefly*-Luziferase-Konstrukt unter Kontrolle eines Promotors mit fünf Gal4-DB-Bindungssequenzen und hoher Grundaktivität (Abb. 5.19).

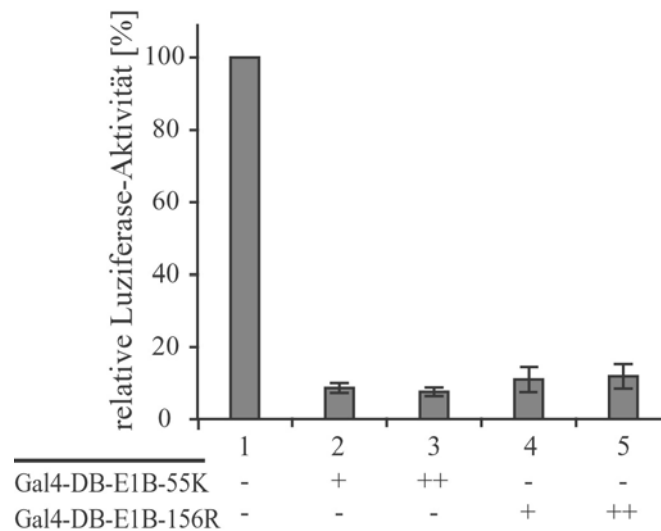


Abb. 5.19: E1B-156R besitzt eine funktionale Transkriptionsrepressionsdomäne. 2×10^5 H1299-Zellen mit $1 \mu\text{g}$ pGalTK-Luc (*Firefly*-Reporter), $1 \mu\text{g}$ pRL-TK (interne Kontrolle) und 1 („+“) bis $2 \mu\text{g}$ („++“) pGal4E1B-55K (Gal4-DB-E1B-55K) bzw. pGal4E1B-156R (Gal4-DB-E1B-156R) mit der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Um mögliche Promotor-Interferenzen auszugleichen, wurden die Ansätze mit dem Vektor pSG424.TCC auf gleiche SV40-Promotormengen aufgefüllt. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und im *Dual-Luciferase® Reporter Assay* (4.8) eingesetzt. Die Luciferase-Aktivitäten wurden relativ zur basalen Aktivität (ohne Expression der Fusionsproteine) angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten. Gal4-DB: DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors Gal4 aus *Saccharomyces cerevisiae*.

Die durchgeführten Transkriptions-Reporter-Versuche zeigen, dass ein Gal4-DB-E1B-156R-Fusionsprotein die Aktivität eines Gal4-DB-Bindemotiv-enthaltenden Promotors signifikant reprimieren kann (Abb. 5.19; Säulen 4 & 5). Hierbei wirkte das E1B-156R-Fusionsprotein ähnlich stark reprimiert wie das entsprechende E1B-55K-Konstrukt (Abb. 5.19; Säulen 2 & 3 bzw. 4 & 5; ca. 12 bzw. 5% Restaktivität). Somit besitzt auch E1B-156R eine funktionale Transkriptionsrepressionsdomäne und kann potenziell als Repressor fungieren.

5.4.7 E1B-156R interagiert mit E1B-55K & besitzt Oligomerisierungspotenzial

Eine weitere mögliche Voraussetzung für die Repression der p53-vermittelten Transaktivierung durch E1B-55K scheint dessen Dimerisierung zu sein. So wird vermutet, dass E1B-55K in dieser Form an p53-Tetramere bindet und deren transaktivierende Wirkung hemmt (Martin und Berk, 1998). Der Bereich in E1B-55K der die Dimerisierung vermittelt ist bisher unbekannt und unter Umständen auch in E1B-156R enthalten.

Um nun aufzuklären, ob E1B-156R ebenfalls Oligomerisierungspotenzial besitzt, wurden Koimmunpräzipitationen mit transfizierten H1299-Zellen durchgeführt. Hierbei wurde in den Zellen gleichzeitig Flag-markiertes E1B-156R und unmarkiertes E1B-156R bzw. E1B-55K exprimiert. Durch direkte Immunpräzipitation von Flag-E1B-156R mit dem Flag-spezifischen Antikörper M2 und anschließenden Nachweis der E1B-Proteine mittels des Primärantikörpers 7C11 sollten die Proteininteraktionen aufgeklärt werden (Abb. 5.20).

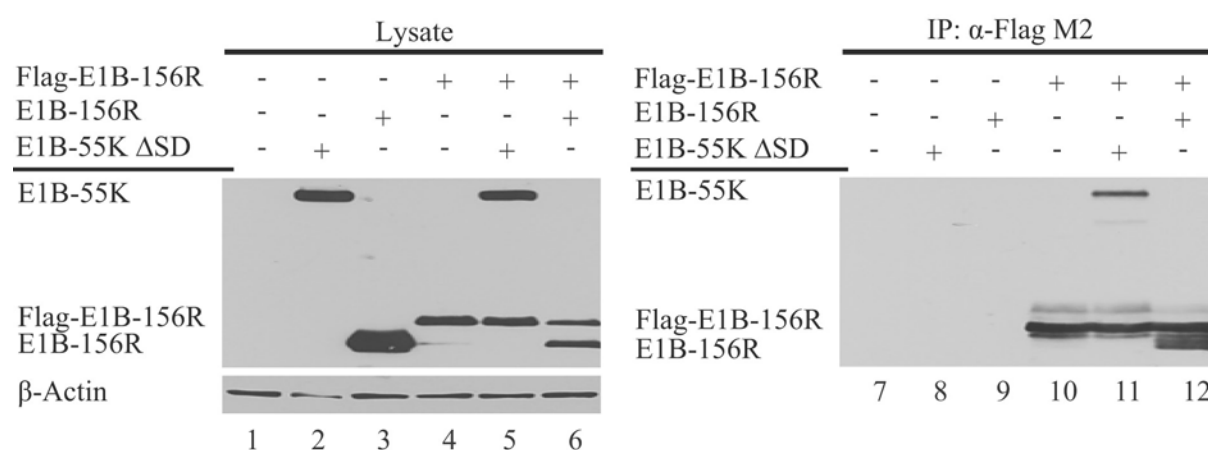


Abb. 5.20: Flag-E1B-156R kann mit E1B-55K und mit E1B-156R interagieren. 7×10^6 subkonfluent gewachsene H1299-Zellen wurden entsprechend der angegebenen Tabelle (Plasmidzugabe je mit „+“ gekennzeichnet) mit $15 \mu\text{g}$ pCMX3b-E1B-156R (Flag-E1B-156R), $7,5 \mu\text{g}$ pE1B-156R (E1B-156R) und $7,5 \mu\text{g}$ pE1B-55K Δ SD (E1B-55K Δ SD) nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Um Promotor-Interferenzen vorzubeugen wurden alle Ansätze mit pcDNA3 auf gleiche CMV-Promotormengen aufgefüllt. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und mit BD-Nativ (4.7.5) aufgeschlossen. In der Immunpräzipitation wurden aus jeweils 4 mg Gesamtzelllysate mittels einer Flag-spezifischen M2-Sepharose-Matrix, Flag-markierte Proteine sowie deren Interaktionspartner isoliert. Anschließend wurden die eingangs gewonnenen Lysate (je $75 \mu\text{g}$ Gesamtprotein) und die Immunpräzipitationen (IP: α -Flag M2) mit 12% SDS-PAGE-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und im *Western Blot* eingesetzt. Zur Detektion der exprimierten E1B-Proteine wurde der Primärantikörper 7C11 verwendet. Als Ladekontrolle diente β -Actin (aus $40 \mu\text{g}$ Gesamtprotein; detektiert mit AC-15).

Die hierbei erhaltenen Daten zeigten, dass Flag-E1B-156R sowohl mit E1B-156R (Abb. 5.20; Spur 12) als auch mit E1B-55K (Abb. 5.20; Spur 11) interagieren kann. Dies weist darauf hin, dass E1B-156R in der Lage ist Homooligomere und zusammen mit E1B-55K Heterooligomere zu bilden. In Analogie zu E1B-55K ist zu vermuten, dass es sich hierbei um Dimere handeln könnte.

5.4.8 E1B-156R hemmt E1B-55K-vermittelte Transkriptionsrepression

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass E1B-156R mit E1B-55K wechselwirkt (5.4.7), ist denkbar, dass E1B-156R die Funktionen des Volllängenproteins beeinflussen kann. Daher wurde der Effekt von E1B-156R auf die Transkriptionsrepression durch E1B-55K überprüft.

Hierzu wurden p53 und die E1B-Proteine in H1299-Zellen koexprimiert und die Repression der p53-vermittelten Transaktivierung durch E1B-55K in Anwesenheit steigender E1B-156R-Mengen untersucht. Als Reporter diente hierbei das bereits in 5.4.5 verwendete p53-regulierte Konstrukt pRE-Luc. Eine Beeinflussung der reprimierenden Wirkung von E1B-55K äußert sich hierbei in einer veränderten Luziferase-Expression, die luminometrisch bestimmt werden kann (Abb. 5.21).

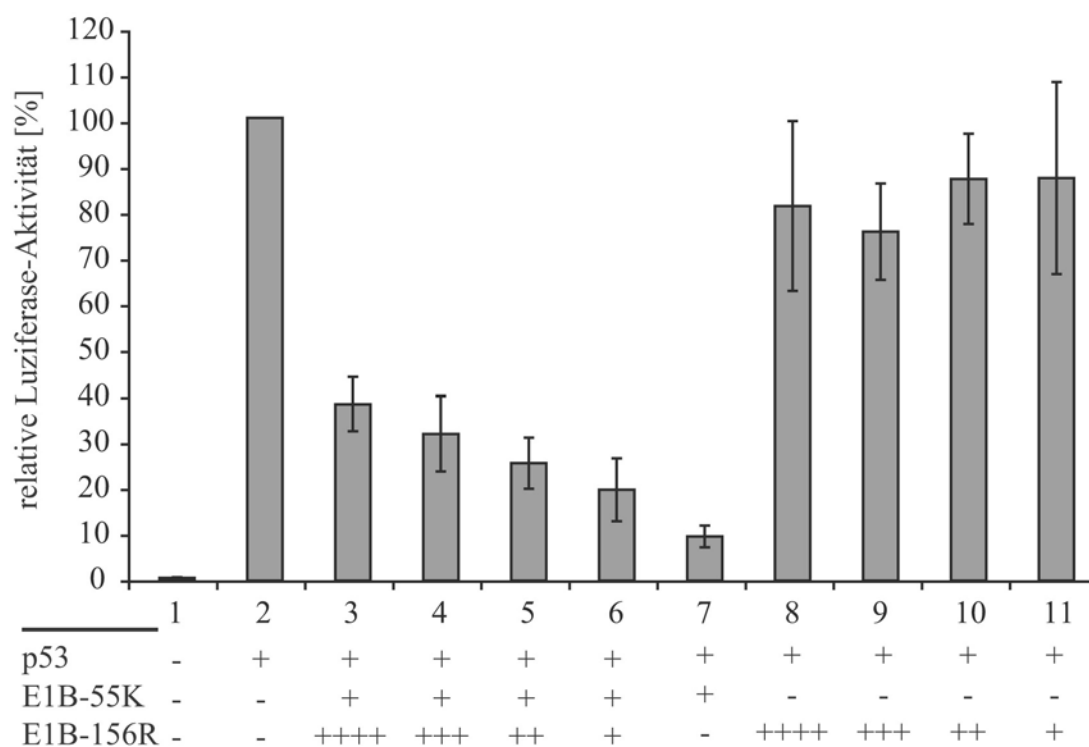


Abb. 5.21: E1B-156R kann die E1B-55K-vermittelte Repression der p53-Aktivität teilweise aufheben. Zur Durchführung der Transkriptions-Reporter-Versuche wurden 2×10^5 H1299-Zellen mit $1 \mu\text{g}$ des p53-induzierbaren *Firefly*-Luziferase-Reporters pRE-Luc sowie einem konstitutiv Renilla-Luziferase exprimierenden Plasmid (pRL-TK; $1 \mu\text{g}$) als interne Kontrolle mit der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Entsprechend der angegebenen Tabelle wurden außerdem $0,5 \mu\text{g}$ pE1B-55K (E1B-55K), $0,5$, 1 , 2 oder $3 \mu\text{g}$ („+“ bis „++++“) pE1B-156R (E1B-156R) sowie $0,025 \mu\text{g}$ des p53-Expressionskonstrukts pC53-SN3 transfiziert. Zum Ausgleich möglicher Promotor-Interferenzen wurden die Ansätze mit pcDNA3 auf gleiche CMV-Promotormengen aufgefüllt. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und im *Dual-Luciferase® Reporter Assay* (4.8) eingesetzt. Die Luziferase-Aktivitäten wurden relativ zur p53-stimulierten Probe (Säule 2) angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen.

Wie sich dabei zeigte, kommt es durch E1B-156R zur teilweisen Aufhebung der reprimierenden Wirkung von E1B-55K. Die beobachtete Wirkung von E1B-156R schien dabei dosisabhängig zu sein (Abb. 5.21; Säulen 3-7). Wie auch unter 5.4.5 beschrieben, hat E1B-156R alleine keinen deutlichen Effekt auf die p53-vermittelte Transaktivierung (Abb. 5.21; Säulen 8-11).

Da E1B-156R somit die Repression der p53-vermittelten Transaktivierung durch E1B-55K zumindest teilweise aufheben kann, stellte sich die Frage ob dieser Funktion eine aktive Transkriptionsrepressionsdomäne in E1B-156R voraussetzt.

Um dies zu testen, musste zuerst ein mutiertes E1B-156R mit inaktiver Transkriptionsrepressionsdomäne erzeugt werden. Die Aktivität der Domäne in E1B-55K ist von der Phosphorylierung dreier C-terminaler Reste (S490, S491 und T495) abhängig (Teodoro und Branton, 1997; Teodoro *et al.*, 1994), deren Äquivalente auch in E1B-156R modifiziert werden (Takayasu *et al.*, 1994). Diese Aminosäuren wurden daher in Analogie zu einem publizierten, repressions-defizienten E1B-55K gegen Alanin (E1B-156RdP: S150A, S151A und T155A) ausgetauscht (Teodoro und Branton, 1997). Das erzeugte Konstrukt (E1B-156RdP) wurde anschließend im Transkriptions-Reporter-Versuch getestet.

Hierbei wurde E1B-156R bzw. E1B-156RdP zusammen mit E1B-55K und p53 in H1299-Zellen koexprimiert und wiederum der Einfluss der verschiedenen viralen Proteine auf den Luziferase-Reporter pRE-Luc untersucht. Eine Beeinflussung der reprimierenden Wirkung von E1B-55K resultiert hierbei in einer veränderten Luziferase-Expression, die luminometrisch bestimmt werden kann (Abb. 5.22).

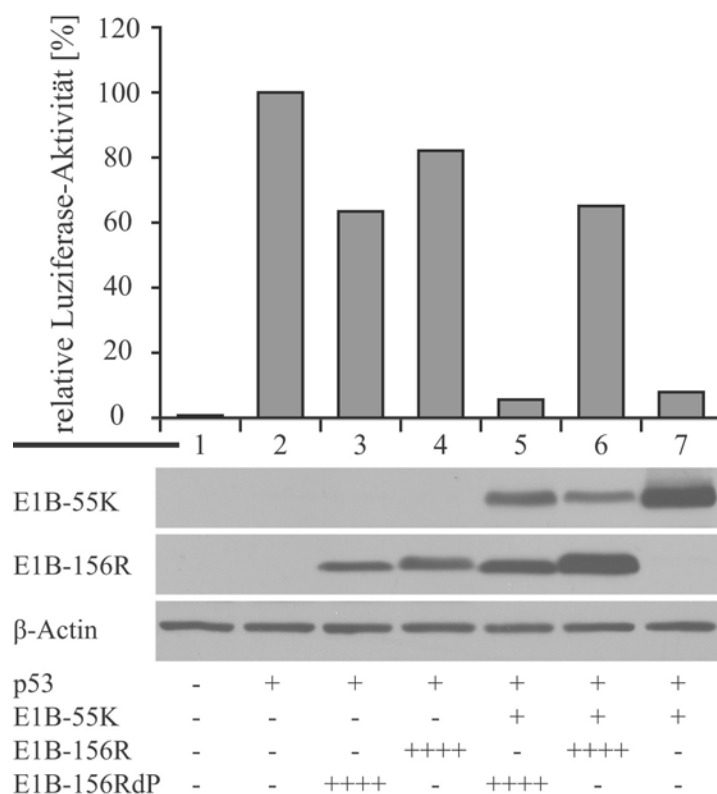


Abb. 5.22: Die Aktivität der Transkriptionsrepressionsdomäne von E1B-156R ist wichtig für die Beeinflussung von E1B-55K. Zur Durchführung der Transkriptions-Reporter-Versuche wurden 2×10^5 H1299-Zellen mit $1 \mu\text{g}$ des p53-induzierbaren *Firefly*-Luziferase-Reporter pRE-Luc sowie mit $1 \mu\text{g}$ des konstitutiv Renilla-Luziferase exprimierenden pRL-TK als interne Kontrolle nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Entsprechend der angegebenen Tabelle (Plasmidzugabe je mit „+“ gekennzeichnet) wurden außerdem $0,5 \mu\text{g}$ pE1B-55K (E1B-55K), $3 \mu\text{g}$ pE1B-156R (E1B-156R) oder pE1B-156RdP (E1B-156RdP) sowie $0,025 \mu\text{g}$ des p53-Expressionskonstrukts pC53-SN3 eingesetzt. Das Plasmid pE1B-156RdP kodiert dabei eine phosphorylierungs-defiziente Mutante des E1B-156R Proteins. Zum Ausgleich möglicher Promotor-Interferenzen wurden die Ansätze mit pcDNA3 auf gleiche CMV-Promotormengen aufgefüllt. 48h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und die Ansätze halbiert. Die eine Hälfte der Zellen wurde im *Dual-Luciferase® Reporter Assay* (4.8) eingesetzt. Die Luziferase-Aktivitäten wurden relativ zur p53-stimulierten Probe (Säule 2) angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen. Zur Kontrolle der Gleichgewichtsmengen der E1B-Proteine wurde die zweite Hälfte der Zellen im *Western Blot* (je $100 \mu\text{g}$ RIPA-Light Lysat über 12% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt) eingesetzt. Zum Nachweis wurde der E1B-spezifische Primärantikörper 2A6 verwendet. Als Ladekontrolle diente β -Actin (aus $50 \mu\text{g}$ Gesamtzelllysate; detektiert mittels AC-15).

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass E1B-156RdP im Gegensatz zu E1B-156R der Repression der p53-vermittelten Transaktivierung durch E1B-55K nicht mehr entgegenwirkt (Abb. 5.22; Säulen 5 & 6). Somit scheint diese Funktion von E1B-156R von der Phosphorylierung der C-terminalen Reste und dadurch der Aktivität der Transkriptionsrepressionsdomäne abhängig zu sein.

Um sicherzustellen, dass der beobachtete Effekt nicht auf Instabilität des E1B-156RdP-Proteins zurückzuführen ist, wurden *Western Blot*-Analysen durchgeführt (Abb. 5.22). Hierbei zeigte sich, dass E1B-156RdP ähnlich stark exprimiert wurde wie E1B-156R. Die Unterschiede in den Stärken der Banden für E1B-156R und E1B-156RdP gehen wahrscheinlich darauf zurück, dass das Wildtypprotein als dicht beisammen liegende Doppelbande (phosphoryliert/nicht-phosphoryliert) vorliegt (Takayasu *et al.*, 1994), während E1B-156RdP nur eine Proteinform bilden kann (Abb. 5.22; Spuren 3 & 4 bzw. 5 & 6).

5.4.9 E1B-156R interagiert mit E4orf6, fördert aber nicht den p53-Abbau

E1B-55K kann den Funktionen von p53 auf verschiedenen Ebenen entgegenwirken. Neben der Repression der p53-vermittelten Transaktivierung und der zytoplasmatischen Sequestration des Tumorsuppressors kann E1B-55K auch in Kooperation mit E4orf6 den Abbau von p53 induzieren (Harada *et al.*, 2002). Diese Funktion wird durch den E1B-55K\E4orf6-E3-Ubiquitin-Ligasekomplex vermittelt (Harada *et al.*, 2002). Hierbei dient E1B-55K wahrscheinlich als Substratlieferant und bindet p53, während E4orf6 den Kontakt zu den zellulären Komponenten des Komplexes vermittelt (Blanchette *et al.*, 2004; Harada *et al.*, 2002; Querido *et al.*, 2001). Sollte E1B-156R ebenfalls mit E4orf6 interagieren können, wäre es denkbar, dass es eine ähnliche Funktion wahrnimmt.

Um dies näher zu untersuchen wurde zuerst überprüft, ob E1B-156R mit E4orf6 interagiert. Hierbei wurden E4orf6 und E1B-156R bzw. E1B-55K in transfizierten H1299-Zellen koexprimiert und in Koimmunpräzipitations-Versuchen auf eventuelle Wechselwirkungen getestet (Abb. 5.23 A). Im Folgenden wurde untersucht, ob E1B-156R, wie E1B-55K, in Kooperation mit E4orf6 zum proteasomalen Abbau von p53 beitragen kann. Dazu wurden p53 und die viralen Proteine in H1299-Zellen koexprimiert. Anschließend wurde im *Western Blot* überprüft, ob die viralen Proteine die p53-Gleichgewichtsmenge beeinflussen können (Abb. 5.23 B).

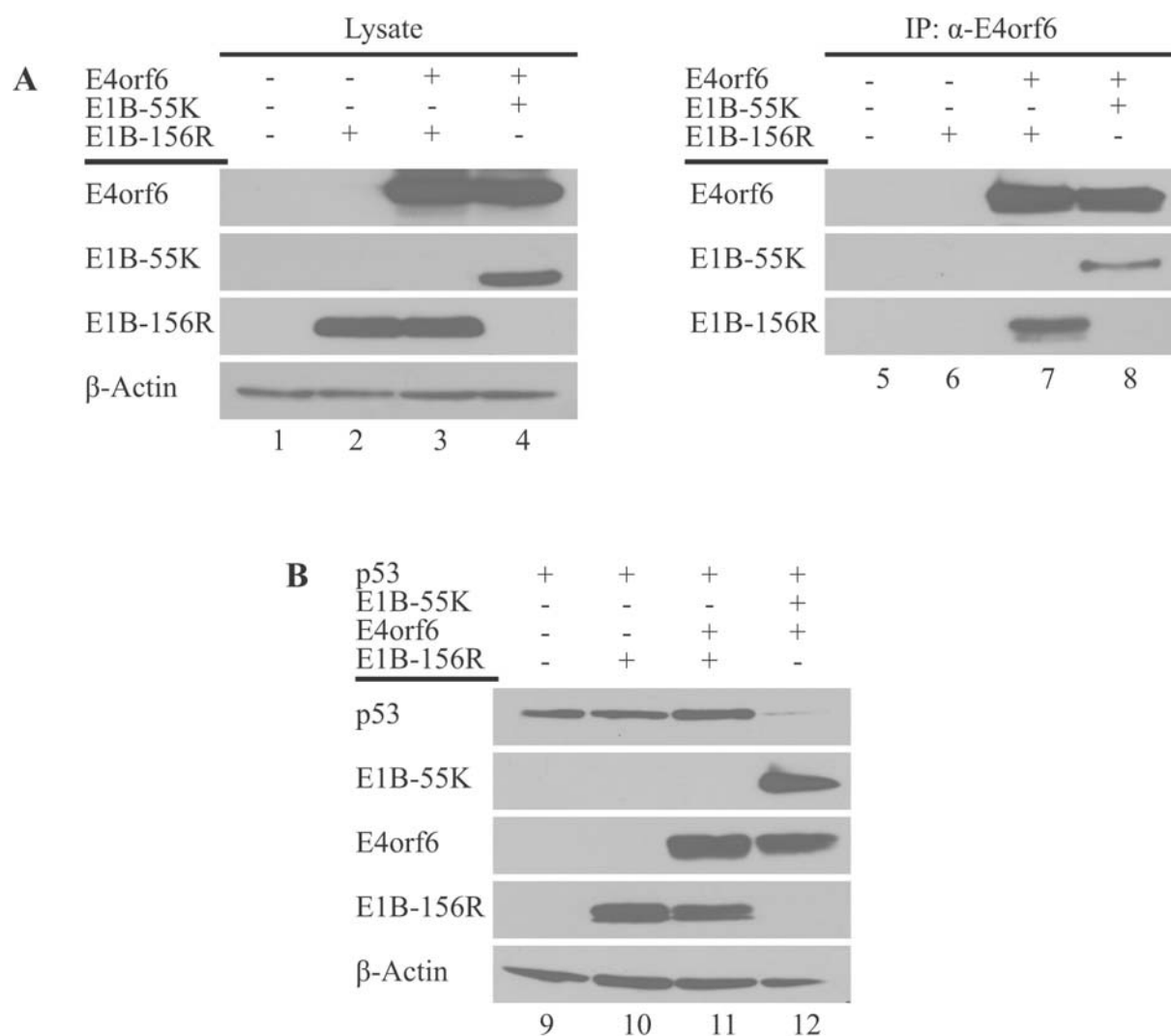


Abb. 5.23: E1B-156R interagiert mit E4orf6, kann jedoch nicht zum proteasomalen Abbau von p53 beitragen. (A) 7×10^6 subkonfluent gewachsene H1299-Zellen wurden entsprechend der angegebenen Tabelle (Plasmidzugabe je mit „+“ gekennzeichnet) mit $4 \mu\text{g}$ pcDNA3-HA-E4orf6 (E4orf6), $2 \mu\text{g}$ pE1B-55K Δ SD (E1B-55K) und $4 \mu\text{g}$ pE1B-156R (E1B-156R) nach der Liposomen-Methode transfiziert. Um Promotor-Interferenzen vorzubeugen wurden alle Ansätze mit pcDNA3 auf gleiche CMV-Promotormengen aufgefüllt. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und mit RIPA-Light (4.7.5) aufgeschlossen. In der Immunpräzipitation wurde mittels des E4orf6-spezifischen Antikörpers (RSA3), direkt E4orf6 (aus 1 mg Gesamtzelllysate) sowie indirekt E1B-55K und E1B-156R (aus 2 mg Gesamtzelllysate) isoliert. Anschließend wurden die Lysate (je $50 \mu\text{g}$ Gesamtprotein; Spuren 1-4) und die Immunpräzipitationen (Spuren 5-8) mit 10% SDS-PAGE-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und im *Western Blot* eingesetzt. (B) Zur Untersuchung des p53-Abbaus wurden $2,25 \times 10^5$ H1299-Zellen entsprechend der angegebenen Tabelle mit p53- ($0,25 \mu\text{g}$ pC53-SN3), E4orf6- ($0,75 \mu\text{g}$ pcDNA3-HA-E4orf6) sowie E1B-55K- bzw. E1B-156R-kodierenden ($0,25 \mu\text{g}$ pE1B-55K Δ SD / pE1B-156R) Plasmiden nach der Liposomen-Methode transfiziert. Um Störungen durch Promotor-Kompetition vorzubeugen, wurden alle Ansätze mit pcDNA3 auf $1,25 \mu\text{g}$ Gesamt-Plasmidmenge aufgefüllt. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen in RIPA-Light (4.7.5) lysiert und $30 \mu\text{g}$ der Lysate auf 10% SDS-PAGE-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und im *Western Blot* analysiert. Die Detektion von E4orf6 und der E1B-Proteine erfolgte mittels der Primärantikörper RSA3 bzw. 7C11 (A) oder 2A6 (B). Als Ladekontrolle wurde β -Actin aus $50 \mu\text{g}$ (A) bzw. $30 \mu\text{g}$ (B) Gesamtzelllysate mittels des Primärantikörpers AC-15 nachgewiesen.

Hierbei zeigte sich, dass E1B-156R (Abb. 5.23 A; Spur 7), ebenso wie E1B-55K (Abb. 5.23 A; Spur 8), zusammen mit E4orf6 kopräzipitiert werden konnte. Dies könnte darauf hinweisen, dass möglicherweise auch E1B-156R zusammen mit E4orf6 einen Ubiquitin-Ligasekomplex bilden kann.

Um dies zu überprüfen wurde der Einfluss von E4orf6 und E1B-156R auf die Gleichgewichtsmengen von p53 untersucht (Abb. 5.23 B). Hierbei konnte bestätigt werden, dass es durch Koexpression von E1B-55K und E4orf6 zu einer Reduktion der p53-Mengen kommt (Abb. 5.23 B; Spuren 9 & 12). Die Expression von E1B-156R alleine oder in Kombination mit E4orf6 wirkt sich hingegen nicht negativ auf die Gleichgewichtsmengen von p53 aus (Abb. 5.23 B; Spuren 10-11). Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass E1B-156R nicht in der Lage ist, in Kooperation mit E4orf6 den proteasomalen Abbau von p53 zu induzieren.

5.5 Hinweise auf alternative Transformationsmechanismen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass E1B-156R, ebenso wie E1B-55K, transformationsfördernd wirken kann (5.4.1). Im Gegensatz zum Volllängenprotein erfüllt es diese Funktion jedoch ohne, die p53-vermittelte Transaktivierung zu reprimieren (5.4.5) und den Tumorsuppressor im Zytoplasma zu sequestrieren (5.4.4).

Dies wirft die Frage auf, über welche alternativen Mechanismen E1B-156R zur Transformation beiträgt. Daher wurde untersucht, ob E1B-156R mit anderen bekannten Interaktionspartnern von E1B-55K wechselwirken kann, deren Modulation sich positiv auf die Transformation auswirken könnte.

5.5.1 E1B-156R interagiert nicht mit Mre11

Mre11 ist eine Komponente des zellulären Mre11/Rad50/NBS1-Komplexes (MRN-Komplex) und wird von E1B-55K sequestriert und inaktiviert (Liu *et al.*, 2005). Der MRN-Komplex ist an der DNA-Reparatur, dem Erhalt der Telomerenden und der Zellzykluskontrolle beteiligt (zur Übersicht: Assenmacher und Hopfner, 2004) und es

wird vermutet, das seine Modulation zum transformationsfördernden Potenzial von E1B-55K beitragen könnte (Härtl *et al.*, 2008; Stracker *et al.*, 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren an den Positionen 454 und 456 des E1B-55K-Proteins wichtig für dessen Interaktion mit Mre11 sind (Härtl *et al.*, 2008). Da auch E1B-156R diesen Sequenzbereich enthält, könnte es möglicherweise ebenfalls mit Mre11 interagieren und so die Funktion des MRN-Komplexes stören. Um dies zu untersuchen, wurden Koimmunpräzipitations-Versuche durchgeführt. Hierzu wurden H1299-Zellen mit Plasmiden zur Expression von E1B-55K bzw. E1B-156R transfiziert und in anschließenden Koimmunpräzipitations-Versuchen eingesetzt. Dabei wurden die E1B-Proteine direkt und Mre11 indirekt präzipitiert (Abb. 5.24).

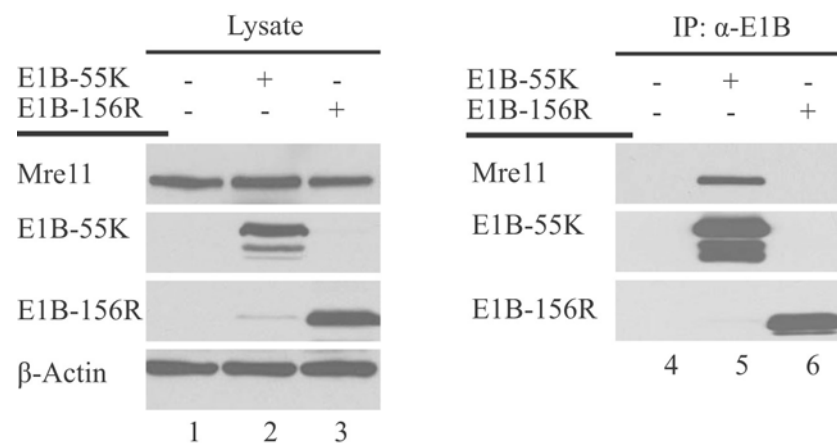


Abb. 5.24: E1B-156R interagiert nicht mit Mre11. 7×10^6 subkonfluent gewachsene H1299-Zellen wurden entsprechend der angegebenen Tabelle (Plasmidzugabe je mit „+“ gekennzeichnet) nach der Liposomen-Methode mit E1B-55K- (8 μ g pE1B-55K) oder E1B-156R-kodierenden (8 μ g pE1B-156R) Plasmiden transfiziert. Um Promotor-Interferenzen vorzubeugen wurden alle Ansätze mit pcDNA3 auf gleiche CMV-Promotormengen aufgefüllt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und mit NP-40 (4.7.5) aufgeschlossen. Aus 2 mg Gesamtzelllysate wurden mittels des Antikörpers 2A6, E1B-55K und E1B-156R direkt und Mre11 indirekt präzipitiert. Anschließend wurden die Lysate (je 100 μ g Gesamtprotein; Spuren 1-3) und die Immunpräzipitationen (Spuren 4-6) mit 12% SDS-PAGE-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und im *Western Blot* eingesetzt. Zur Detektion der exprimierten E1B-Proteine wurde der Primärantikörper 7C11 verwendet. Mre11 wurde mittels ab397 nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente β -Actin (aus 30 μ g Gesamtprotein; detektiert mit AC-15).

Hierbei zeigte sich, dass in den Lysaten, wie erwartet, exogenes E1B-55K (Abb. 5.24; Spur 2) und E1B-156R (Abb. 5.24; Spur 3) detektiert werden konnte. Da in diesen Experimenten ein spleißkompetentes E1B-55K-Expressionsplasmid verwendet

wurde, waren auch in Spur 2 geringe Mengen E1B-156R detektierbar. Das endogen exprimierte Mre11 war in allen Zelllysaten in vergleichbaren Mengen nachweisbar (Abb. 5.24; Spuren 1-3). In der durchgeführten Immunpräzipitation mit dem E1B-spezifischen Antikörper 2A6, konnte Mre11 hingegen nur in der E1B-55K-haltigen Probe detektiert werden (Abb. 5.24; Spur 5). Dies bestätigt die bekannte Interaktion beider Proteine (Carson *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005). E1B-156R wurde unter denselben Bedingungen zwar ebenfalls präzipitiert (Abb. 5.24; Spur 6), war jedoch nicht in der Lage mit Mre11 zu interagieren.

Da E1B-156R somit im Gegensatz zu E1B-55K nicht mit Mre11 interagieren kann, ist es unwahrscheinlich, dass ein Mre11-vermittelter Prozess für das transformationsfördernde Potenzial des E1B-Proteins verantwortlich ist.

5.5.2 E1B-156R interagiert mit dem Apoptoseregulator Daxx

Das zelluläre Protein Daxx interagiert mit dem C-terminalen Teil von E1B-55K, der auch in E1B-156R zu finden ist (Zhao *et al.*, 2003) und stellt einen potenziellen Kandidaten für die Vermittlung des transformierenden Potenzials von E1B-156R dar. Daxx erfüllt zahlreiche Funktionen und scheint auf verschiedenen Wegen an der Regulation apoptotischer Prozesse beteiligt zu sein (zur Übersicht: Norbury und Zhivotovsky, 2004).

Um festzustellen, ob E1B-156R, wie E1B-55K, mit humanem Daxx wechselwirken kann, wurden die E1B-Proteine in H1299-Zellen mit Daxx koexprimiert und in Koimmunpräzipitations-Versuchen auf Wechselwirkung mit Daxx getestet (Abb. 5.25).

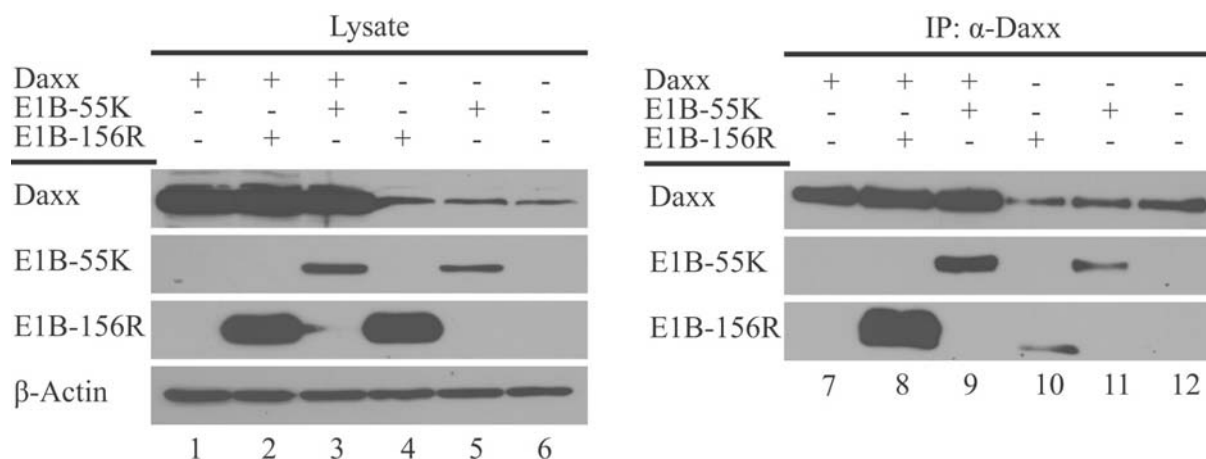


Abb. 5.25: E1B-156R interagiert mit exogenem und endogenem Daxx. 7×10^6 subkonfluent gewachsene H1299-Zellen wurden entsprechend der angegebenen Tabelle (Plasmidzugabe je mit „+“ gekennzeichnet) nach der Kalziumphosphat-Methode mit Daxx- (25 μ g phDaxx-HA), E1B-55K- (7,5 μ g pE1B-55K Δ SD) und E1B-156R-kodierenden (15 μ g pE1B-156R) Plasmiden transfiziert. Um Promotor-Interferenzen vorzubeugen wurden alle Ansätze mit pcDNA3 auf gleiche CMV-Promotormengen aufgefüllt. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und mit NP-40 (4.7.5) aufgeschlossen. In der Immunpräzipitation wurde aus jeweils 5 mg Gesamtzelllysate mittels des Antikörpers Anti-Daxx (α -Daxx) endogenes sowie exogenes Daxx direkt sowie E1B-55K und E1B-156R indirekt präzipitiert. Anschließend wurden die Lysate (50 μ g Gesamtprotein für E1B-Proteine; 100 μ g Gesamtprotein für Daxx; Spuren 1-6) und die Immunpräzipitationen (Spuren 7-12) mit 12% SDS-PAGE-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und im *Western Blot* eingesetzt. Zur Detektion der exprimierten E1B-Proteine wurde der Primärantikörper 2A6 eingesetzt. Daxx wurde mittels Anti-Daxx nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente β -Actin (aus 25 μ g Gesamtprotein; detektiert mit AC-15).

In den verwendeten Lysaten konnte neben E1B-156R (Abb. 5.25; Spuren 2 & 4) und E1B-55K (Abb. 5.25; Spuren 3 & 5) auch exogenes und endogenes Daxx nachgewiesen werden (Abb. 5.25; Spuren 1-3 bzw. 4-6). Durch Immunpräzipitationen von Daxx mit einem Daxx-spezifischen Antikörper konnte gezeigt werden, dass E1B-156R (Abb. 5.25; Spuren 10 & 11) genau wie E1B-55K (Abb. 5.25; Spuren 8 & 9) durch überexprimiertes (Abb. 5.25; Spuren 7-9) und sogar durch endogenes Daxx (Abb. 5.25; Spuren 10-12) kopräzipitiert werden kann. Die Tatsache, dass die direkt präzipitierte Daxx-Menge mit der Menge der kopräzipitierten E1B-Proteine korreliert zeigt, dass E1B-156R und E1B-55K spezifisch mit Daxx interagieren.

6 DISKUSSION

Das adenovirale E1B-55K-Protein erfüllt in Infektion und Transformation verschiedenste wichtige Funktionen (zur Übersicht: Berk, 2007) und ist seit seiner Identifizierung 1977 Ziel intensiver Forschungen (Levinson und Levine, 1977). Bereits 1979 wurde erstmals über das Auftreten verkürzter Isoformen dieses Proteins spekuliert (Perricaudet *et al.*, 1979). In der Folge wurden entsprechende, alternativ gespleißte mRNAs und auch die zugehörigen Proteine E1B-156R, E1B-93R und E1B-84R (E1BN-Proteine) in Ad2- und Ad5-infizierten Zellen identifiziert. Über mögliche Funktionen dieser Proteine konnte bisher jedoch nur spekuliert werden (Bos *et al.*, 1981; Lucher *et al.*, 1984; Montell *et al.*, 1984; Perricaudet *et al.*, 1979; Takayesu *et al.*, 1994). In Experimenten in denen neben E1B-55K auch die E1BN-Proteine gebildet werden, wird bis heute in der Regel die Möglichkeit ignoriert, dass diese durch eigene Aktivitäten die Untersuchungen beeinflussen könnten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu klären, ob E1B-156R, E1B-93R und E1B-84R Funktionen in der adenoviralen Infektion und/oder Transformation wahrnehmen. Insbesondere sollte hierbei das vermutete transformationsfördernde Potenzial von E1B-156R näher untersucht werden.

6.1 Hinweise auf Funktionen der E1BN-Proteine in der Infektion

6.1.1 Regulation des alternativen Spleißens an SA2

Zur Aufklärung der Funktionen der E1BN-Proteine in der Infektion wurden Virusmutanten generiert, die Defekte in der Expression von einzelnen oder mehreren E1B-Proteinen aufweisen (Abb. 5.1).

Aufgrund der komplexen Spleißprozesse in der E1B-Region und der Nutzung einzelner Sequenzabschnitte für die Kodierung mehrere Proteine (Abb. 2.5), sind die Möglichkeiten zur selektiven Inaktivierung hier jedoch sehr begrenzt. Es wurden daher charakteristische Spleißstellen inaktiviert oder Stopkodons eingeführt (Abb. 5.1).

Die eingebrachten Veränderungen führten in fast allen Fällen zum gewünschten Ergebnis, lediglich die selektive Unterdrückung der E1B-156R-Produktion durch

Inaktivierung der Spleißakzeptorstelle SA2 war problematisch. So zeigte sich, dass durch die Spleißstellenmutation, bis dahin inaktive Sequenzen in der Nähe von SA2 als Spleißakzeptoren verwendet werden.

Die Nutzung kryptischer Sequenzen nach Mutation der natürlichen Spleißstellen wurde in der Literatur bereits beschrieben (zur Übersicht: Kalnina *et al.*, 2005; Kralovicova und Vorechovsky, 2007; Wessagowit *et al.*, 2005). Die molekulare Ursache dieser Ereignisse liegt wohl darin, dass die Spleißdonor-, die Spleißakzeptor- und die Verzweigungsstelle nur einen Teil der Information enthalten, die für den Spleißprozess benötigt wird. So spielen in humanen Zellen insbesondere verschiedene sekundäre regulatorische Sequenzen (*splicing enhancer & splicing silencer*) eine bedeutende Rolle. Diese Sequenz-Elemente interagieren mit unterschiedlichsten Spleißfaktoren, fördern oder reprimieren den Spleißprozess und können maßgeblich zur Nutzung von Spleißstelle beitragen (zur Übersicht: Hui und Bindereif, 2005; Lim und Burge, 2001).

Der Einfluss der sekundären regulatorischen Elemente auf einzelne Spleißereignisse ist in der Regel umgekehrt proportional zum Konservierungsgrad der jeweiligen Spleißstelle. So werden starke Spleißstellen nur wenig von sekundären Elementen beeinflusst, während diese für die Nutzung schwacher Spleißstellen häufig essentiell sind (Graveley, 2000). Da alternativ genutzte Spleißstellen häufig nur eine schwache Sequenz-Konservierung aufweisen, werden Spleißereignisse hier hauptsächlich durch sekundäre regulatorische Sequenzen bestimmt (Dewey *et al.*, 2006). Unter solchen Bedingungen können demnach benachbarte, kryptische Sequenzen als Ersatz für inaktivierte schwache Spleißstellen genutzt werden.

Um die Stärke der verschiedenen Spleißstellen in der Ad5-E1B-Region abzuschätzen, wurde das Programm NetGene2 verwendet. Es gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine gegebene Sequenz als Spleißstelle genutzt wird (Brunak *et al.*, 1991) Hebsgaard 1996; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>). Hiermit konnte gezeigt werden, dass SA2 (Abb. 2.5) nur eine schwache Spleißstelle darstellt, da sie nur mit geringer Konfidenz (20%) identifiziert wurde. Die konstitutiv genutzte Spleißakzeptorstelle SA3 erreicht hingegen, wie erwartet, eine wesentlich höhere Wertung (43% Konfidenz). Daraus lässt sich schließen, dass der Spleißprozess an SA2 wohl stark von sekundären Elementen und weniger vom Akzeptor an sich

abhängig ist. Auch sind die nach Inaktivierung von SA2 in Δ SA2 und Δ SA2.2 (Tab. 5.2) genutzten Spleißakzeptoren im Vergleich zur natürlichen Spleißstelle nur minimal schwächer (jeweils 19% Konfidenz), so dass ihre Nutzung nachvollziehbar ist. Aufgrund der Vielfalt der sekundären Elemente und der komplexen Regulation ist bisher keine zuverlässige Vorhersage alternativer Spleißprozesse möglich (Matlin *et al.*, 2005). Daher muss, wie in dieser Arbeit geschehen, empirisch ermittelt werden, ob durch Inaktivierung einer Spleißstelle ein Spleißprozess unterbunden werden kann.

6.1.2 E1B-84R, E1B-93R und E1B-156R sind funktionale Proteine

Ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, aufzuklären ob die E1BN-Proteine funktionale Proteine darstellen. Wie die Untersuchungen mit den Virusmutanten 84R Δ C und Δ SA1 zeigten, scheinen E1B-84R und E1B-93R tatsächlich einen Einfluss auf den Verlauf der viralen Infektion zu haben (5.2). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch E1B-156R funktional ist und verschiedene Interaktionen mit zellulären und viralen Faktoren eingehen kann (5.4). Diese Beobachtungen zeigen also, dass die E1BN-Proteine funktional sind und Aufgaben in der viralen Replikation und/oder Transformation wahrnehmen können.

Die verschiedenen C-terminalen Sequenzen der E1BN-Proteine vermitteln dabei wahrscheinlich Unterschiede in der Funktion der Proteine. So enthält der C-Terminus von E1B-156R eine funktionale Transkriptionsrepressionsdomäne, die in E1B-84R und E1B-93R nicht enthalten ist (5.4.6). Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung der individuellen C-terminalen Sequenzen ergibt sich aus den Untersuchungen an 84R Δ C. 84R Δ C exprimiert anstatt des E1B-84R-Proteins ein 80 Aminosäuren großes Restprotein E1B-84R Δ C, dem bis auf ein Glutamin der C-Terminus von E1B-84R (...-Gln-Pro-Pro-Pro-Pro) fehlt (5.2.3.1). Dass dennoch Effekte beobachtet werden können, hebt die funktionelle Bedeutung dieses individuellen Bereiches hervor. In der Literatur wurde dem C-Terminus von E1B-84R bisher noch keine spezifische Funktion zugeordnet. Die Sequenz ähnelt allerdings den Prolinreichen Erkennungsmotiven verschiedener Proteininteraktionsdomänen wie SH3- oder WW-Domänen (Li, 2005). Es ist daher denkbar, dass der E1B-84R-C-Terminus

durch Vermittlung spezifischer Wechselwirkungen zur Funktion des Proteins beiträgt.

Die hier gewonnenen Daten zeigen zwar, dass die E1BN-Proteine funktional sind, jedoch sind sie nicht ausreichend, um einen Verlust von E1B-55K in der Virusinfektion effizient zu kompensieren. So zeigen E1B-55K-defiziente Viren unabhängig von der Expression der E1BN-Proteine deutliche Defekte in der Produktion der Strukturproteine, der Nachkommenviren und im Abbau von p53, Mre11 und Rad50 (5.2). Diese Beobachtungen entsprechen denen, die bereits mit anderen Virusmutanten gemacht wurden, die Defekte in E1B-55K und den E1BN-Proteinen aufweisen (Babiss und Ginsberg, 1984; Barker und Berk, 1987; O'Shea *et al.*, 2004; Pilder *et al.*, 1986; Shen *et al.*, 2001; Stracker *et al.*, 2002).

Die Frage wie die E1BN-Proteine, insbesondere E1B-84R und E1B-93R, auf molekularer Ebene wirken, kann bisher noch nicht vollständig beantwortet werden. Denkbar sind im Prinzip jedoch zwei verschiedene Wirkmechanismen: zum einen könnten die Proteine durch Modulation der E1B-55K-Funktionen wirken, zum anderen könnten sie aber auch E1B-55K unabhängig agieren.

Eine Modulation von E1B-55K könnte dabei indirekt oder auch direkt durch Wechselwirkung mit dem Volllängenprotein erfolgen, da zumindest für E1B-156R eine Interaktion mit E1B-55K gezeigt werden konnte (5.4.7). E1B-55K liegt in der Zelle als Dimer vor und ist wohl auch in dieser Form funktionell aktiv (Martin und Berk, 1998), daher ist vorstellbar, dass die E1BN-Proteine durch Ausbildung verschiedener E1BN/E1B-55K-Heterodimere die Aktivitäten von E1B-55K beeinflussen könnten.

Daneben bleiben auch E1B-55K-unabhängige Funktionen der E1BN-Proteine denkbar, die durch Wechselwirkungen mit anderen viralen oder zellulären Faktoren vermittelt werden. Dies trifft zumindest auf E1B-156R zu, das mit E4orf6 (5.4.9), p53 (5.4.4) und Daxx (5.5.2) interagieren kann und transformationsförderndes Potenzial besitzt (5.4.1).

6.1.3 Die Inaktivierung von E1B-93R oder E1B-84R beeinflusst die Infektion

Bei der Untersuchung des E1B-93R-defizienten Virus Δ SA1 zeigte sich, dass der Verlust des Proteins zu einem moderaten Defekt in der Produktion infektiöser Nachkommenviren kommt (5.2.1), der mit einer verspäteten und abgeschwächten Strukturproteinsynthese einhergeht (5.2.2).

Eine denkbare Erklärung hierfür wäre eine Beeinträchtigung der E1B-55K-Funktionen in Folge der E1B-93R-Inaktivierung, da das Vollängenprotein in Kooperation mit E4orf6 die Synthese der viralen Strukturproteine fördert (Beltz und Flint, 1979; Dobner und Kzhyshkowska, 2001; Flint und Gonzalez, 2003; Halbert *et al.*, 1985; Harada und Berk, 1999; Pilder *et al.*, 1986; Woo und Berk, 2007). Im Zusammenhang mit einer Störung der E1B-55K-Funktionen steht unter Umständen auch das verspätete Auftreten von E4orf6 in Δ SA1-infizierten Zellen (5.2.4.1), da viele Funktionen von E1B-55K von der Verfügbarkeit von E4orf6 abhängig sind (Dobner und Kzhyshkowska, 2001; Harada *et al.*, 2002; Querido *et al.*, 2001; Stracker *et al.*, 2002). Auch der beobachtete, verspätete Abbau von Rad50 könnte durch diese verspätete Akkumulation von E4orf6 verursacht werden (5.2.4.3). Wobei unklar ist, wieso der Abbau von p53 und Mre11 nicht betroffen zu sein scheint.

Da das E1B-93R-defiziente Virus Δ SA1 Defekte in der viralen Replikation und der Synthese der Strukturproteine aufweist, kann man folgern, dass E1B-93R Funktionen erfüllt, die den Infektionsverlauf positiv beeinflussen. Auch könnte sich die E1B-93R-Expression positiv auf die Akkumulation von E4orf6 auswirken.

Im Gegensatz zu Δ SA1 zeigte die Virusmutante 84R Δ C keinen Defekt bei der Synthese später Strukturproteine (5.2.2). Auch die Menge produzierter Nachkommenviren entspricht weitgehend der des Wildtypvirus (5.2.1). Auffällig bei dieser Virusmutante ist jedoch, die im Vergleich zum Wildtyp, starke diffuse nukleäre Lokalisation von E1B-55K bei gleichzeitigem, fast vollständigem Fehlen zytoplasmatischer E1B-55K-haltiger Strukturen 16 h p. i. (5.2.3.2). Daneben liegt auch E4orf6 in der 84R Δ C-Infektion im Vergleich zum Wildtypvirus in erhöhten Konzentrationen vor (5.2.4.1).

Die Ursache für die veränderte E1B-55K-Lokalisation könnte in einer Beeinflussung des Pendelns von E1B-55K zwischen Zellkern und Zytoplasma liegen. Aufgrund dieses dynamischen Wechsels zwischen beiden Kompartimenten stellt die beobachtbare Lokalisation von E1B-55K ein Verteilungsgleichgewicht dar (Dosch *et al.*, 2001; Kratzer *et al.*, 2000). Die für 84R Δ C beobachtete Verschiebung dieses Gleichgewichts könnte auf eine funktionelle und/oder physikalische Interaktion zwischen E1B-55K und E1B-84R hinweisen. Alternativ könnte die Veränderung aber auch durch die wesentlich erhöhten E4orf6-Mengen verursacht werden (5.2.4.1). So pendelt E1B-55K zwar unabhängig von E4orf6 (Dosch *et al.*, 2001; Kratzer *et al.*, 2000), jedoch wurde beschrieben, dass dessen Expression in Transfektion und Infektion den kernständigen Anteil des E1B-Proteins erhöhen kann (Armentano *et al.*, 1995; Chastain-Moore *et al.*, 2003; Goodrum *et al.*, 1996; Ketner *et al.*, 1989; Orlando und Ornelles, 2002).

Die für das E1B-84R-defiziente Virus 84R Δ C gemachten Beobachtungen, lassen im Umkehrschluss vermuten, dass E1B-84R in der Infektion die E4orf6-Gleichgewichtsmenge begrenzen und die Ausbildung kernnaher E1B-55K-Strukturen fördern kann.

6.1.4 Hinweise auf funktionelle Wechselwirkungen der E1BN-Proteine

Auffällig bei der Untersuchung der hergestellten Virusmutanten war, dass die individuelle Inaktivierung von E1B-93R und E1B-84R zu spezifischen Effekten führte, während der gemeinsame Verlust aller E1BN-Proteine (Δ SD) unter den gegebenen Versuchsbedingungen jedoch keinen merklichen Defekt verursachte (5.2). Auch für eine Adenovirus Typ 2 Variante, bei der eine Δ SD entsprechende Mutation eingefügt wurde (Ad2 pm2250), wurde kein Defekt in der viralen Replikation beschrieben (Montell *et al.*, 1984). Diese Beobachtung veranlasste Montell und Kollegen zu der Vermutung, dass die E1BN-Proteine keine wichtigen Funktionen in der Infektion erfüllen (Montell *et al.*, 1984).

Die Tatsache, dass die Spleißdonorstelle SD1 innerhalb der humanen Adenoviren konserviert zu sein scheint und auch aktiv ist (2.3.3), die zeitlich regulierte Expression der E1BN-Proteine (Takayasu *et al.*, 1994; Teodoro und Branton, 1997),

sowie die für $\Delta SA1$ und $84R\Delta C$ beobachteten Veränderungen (5.2) weisen jedoch auf eine Funktionalität der Proteine hin.

Eine mögliche Erklärung für das Verhalten von ΔSD wäre die Kompensation potenzieller Defekte durch Bildung E1BN-ähnlicher Proteine, ausgehend von aberrant gespleißten mRNAs. So, gibt es für ΔSD (5.1.2) und eine analoge Ad2-Virusmutante, pm2250 (Montell *et al.*, 1984) Hinweise auf die Nutzung kryptischer Spleißdonorstellen bei Verlust von SD1. Allerdings konnte weder für ΔSD noch für Ad2 pm2255 die Expression zugehöriger Proteine nachgewiesen werden (Montell *et al.*, 1984; diese Arbeit, 5.2.3.1).

Eine andere mögliche Erklärung könnte eine gegensätzliche Wirkung der verschiedenen E1BN-Proteine sein. Somit könnten sich die Einzelwirkungen in der Summe aufheben und nur durch das Fehlen einzelner Komponenten, wie in $\Delta SA1$ und $84R\Delta C$ sichtbar werden. So konnte gezeigt werden, dass sich eine Mutation von E1B-84R positiv auf die E4orf6-Expression auswirkt (Abb. 5.8), während ein E1B-93R-Defekt diese negativ beeinflusst. Bei kombinierter Inaktivierung der E1BN-Proteine in ΔSD scheinen sich die Effekte hingegen gegenseitig zu kompensieren, so dass die E4orf6-Expression hier wieder der, des Wildtypvirus gleicht. Neben diesen Beobachtungen geben auch Unterschiede im Abbau von Rad50 Hinweise auf eine mögliche gegenseitige Kompensation der E1BN-Wirkungen. So scheint der selektive Verlust von E1B-84R ($84R\Delta C$) oder E1B-93R ($\Delta SA1$) den Abbau von Rad50 nach Infektion zu verlangsamen. Bei der für alle E1BN-Proteine negativen Virusmutante ΔSD konnte hingegen erneut kein Defekt beobachtet werden (Abb. 5.10). Dies könnte durch einen hemmenden Einfluss von E1B-156R erklärt werden, das sowohl von $84R\Delta C$ als auch von $\Delta SA1$ hergestellt wird, bei ΔSD jedoch fehlt.

Sollte tatsächlich eine derartig vernetzte Wirkung der E1BN-Proteine vorliegen, könnte sie dazu dienen, die Wirkung der E1B-Proteine zu flexibilisieren und so eine Anpassung an die zellulären Gegebenheiten erlauben. Dies könnte helfen eine optimale Replikation von Ad5 in verschiedenen Zelltypen und unter unterschiedlichen Bedingungen sicherzustellen.

Die Tatsache, dass sich ΔSD und das Wildtypvirus in den durchgeführten Untersuchungen kaum unterscheiden, würde dann darauf hindeuten, dass diese flexibilisierende Wirkung der E1BN-Proteine bei Infektion von A549-Zellen mit *moi*

50 nicht benötigt wird. Da unter diesen Bedingungen eine sehr effiziente Replikation der Viren möglich ist, ist es leicht vorstellbar, dass die optimierende Wirkung eines potenziellen „E1BN-Netzwerkes“ keine weiteren Vorteile bringt, während eine Missregulation durch Ausfälle einzelner Komponenten hingegen mit Defekten verbunden ist.

Überdies konnten Hinweise dafür gefunden werden, dass auch E1B-55K selbst in ein solches funktionales Netzwerk eingebunden sein könnte. So resultiert die Inaktivierung von E1B-55K (55K⁻) nur in Anwesenheit der E1BN-Proteine in einer Reduktion der E4orf6-Menge, während dies im E1B⁻-Virus nicht beobachtet wurde (5.2.4.1).

6.2 Funktionsstudien an E1B-156R

6.2.1 E1B-156R als transformationsförderndes Protein

In dieser Arbeit wurden erste Hinweise auf Funktionen der E1BN-Proteine E1B-93R und E1B-84R in der Infektion gefunden. Da es jedoch aufgrund der molekularen Gegebenheiten nicht möglich war, eine spezifisch E1B-156R-defekte Virusmutante zu erzeugen, konnte dieses interessante Protein nicht im viralen Kontext untersucht werden. Von besonderem Interesse ist das Protein durch seinen 77 Aminosäurelangen C-Terminus, der dem von E1B-55K entspricht. Dieser Bereich enthält in E1B-55K eine Transkriptionsrepressionsdomäne, die für die Repression von p53 und die transformationsfördernde Wirkung von E1B-55K von Bedeutung ist (Martin und Berk, 1998; Martin und Berk, 1999; Teodoro und Branton, 1997; Teodoro *et al.*, 1994; Yew und Berk, 1992; Yew *et al.*, 1994). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob und welche Funktionen E1B-156R außerhalb des viralen Kontextes wahrnimmt.

Hierbei konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass E1B-156R transformationsförderndes Potenzial besitzt und in Kooperation mit E1A primäre Rattenzellen transformieren kann (5.4.1). Dies ist die erste biologische Funktion, die E1B-156R zugeordnet werden konnte. Aus diesen Versuchen gewonnene E1A/E1B-156R-transformierte Zelllinien zeigen dabei morphologische Veränderungen, Wachstumsraten und Sättigungszellichten, die E1A/E1B-55K-exprimierenden Zellen ähneln. Somit

scheint E1B-156R, wie E1B-55K die Fähigkeit zu besitzen zur vollständigen zellulären Transformation primärer Zellen beizutragen (5.4.2).

6.2.2 E1B-156R und „Hit & Run“-Transformation

Auffällig bei den durch E1A/E1B-156R-Transformation gewonnenen Zelllinien ist, dass sie im Gegensatz zu E1A/E1B-55K-transformierten Zellen nur unregelmäßig virale Proteine exprimieren und dass teilweise nicht einmal virale DNA nachweisbar ist (5.4.3). Diese Beobachtung steht im Widerspruch zur klassischen Vorstellung der viralen Transformation, die die dauerhafte Expression der viralen Onkogene fordert (2.2.1.1) und weist auf eine Transformation nach der „Hit & Run“-Hypothese (Skinner, 1976) hin (2.2.1.2). Laut dieser Hypothese kann durch transiente Anwesenheit viraler Proteine ein Transformationsprozess initiiert werden, der auch nach Verlust der viralen Faktoren weiterläuft (2.2.1.2).

Die Frage warum es bei Transformation durch E1A und E1B-156R zum Verlust der viralen Sequenzen kommen kann, während dies bei E1A/E1B-55K nicht beobachtet wird (Graham *et al.*, 1977; Hutton *et al.*, 2000; Zantema *et al.*, 1985), kann noch nicht eindeutig beantwortet werden. Die bekannten Fakten erlauben es zumindest, ein vorläufiges Modell der Zusammenhänge zu entwerfen.

Ein zentraler Faktor der adenoviralen Transformation ist E1A. Das adenovirale Protein induziert zum einen durch Interaktion mit zellulären Faktoren die Zellzyklusprogression und überwindet die wachstumsinhibitorischen Wirkungen des Zell/Zell-Kontakts sowie von Seneszenz-Signalen (zur Übersicht: Berk, 2005; Endter und Dobner, 2004). Im Zuge dieser Funktionen wird genomische Instabilität induziert (Caporossi und Bacchetti, 1990; Hong *et al.*, 2008) und es kommt zur Stabilisierung von p53 sowie zur Induktion von Apoptosemechanismen (Debbas und White, 1993; Grand *et al.*, 1994; Hong *et al.*, 2008; Lowe und Ruley, 1993; Sabbatini *et al.*, 1995; Teodoro *et al.*, 1995; White, 1993). Diese limitieren wiederum das transformierende Potenzial von E1A, so dass es nur selten zur Transformation von Nagerzellen durch E1A allein kommt (zur Übersicht: Berk, 2005; Russell, 2000). Diese Selbstlimitation ähnelt den Verhältnissen die in Neoplasien beobachtet werden können. Diese Gewebsneubildungen, sind häufig Vorläufer maligner Tumore und

zeichnen sich durch eine Aktivierung des Zellzyklus und Induktion genomischer Instabilität aus. In Folge dessen wird ihr Wachstum durch Induktion von Apoptose und/oder Seneszenz begrenzt. Erst wenn diese Kontrollmechanismen – z.B. durch Inaktivierung von p53 – beeinträchtigt werden, kann es zur onkogenen Transformation kommen (zur Übersicht: Halazonetis *et al.*, 2008). In der adenoviralen Transformation kann dies durch Koexpression von E1B-55K geschehen, da hierdurch p53 inaktiviert und Apoptose inhibiert wird. So kommt es trotz einer E1A-induzierten Anreicherung von p53 zur Unterdrückung der Apoptose und einer gesteigerten Transformationsrate (Debbas und White, 1993; Graham, 1984; Martin und Berk, 1998; siehe auch AB120 Abb. 5.14). In so transformierten Zellen werden E1A und E1B-55K in der Regel dauerhaft exprimiert (Lowe und Ruley, 1993; Nevels *et al.*, 2001; Ruben *et al.*, 1982). Ursache für den Erhalt der Proteine, scheint hier eine wechselseitige positive Beeinflussung zu sein: Ginge E1B-55K verloren, käme es zur Apoptoseinduktion und zum Absterben der Zelle. Ginge hingegen E1A verloren, würde der Zellzyklus nicht mehr dauerhaft stimuliert, was die Zellvermehrung einschränkt. Entsprechend wurde auch gezeigt, dass die E1B-Region unabhängig von E1A keine Zelltransformation induzieren kann (van den Elsen *et al.*, 1982).

Die Beobachtung, dass die viralen Proteine bei Transformation mittels E1A und E1B-156R verloren gehen (5.4.3), könnte bedeuten, dass das E1BN-Protein zwar die Transformation fördert aber nicht in der Lage ist, die Apoptoseinduktion durch E1A wirkungsvoll zu unterdrücken. Der daraus resultierende Selektionsdruck sollte dafür sorgen, dass nur Zellen transformiert werden, in denen dieser negative Einfluss durch zelluläre Veränderungen (z.B. Mutationen) behoben wurde. Dies kann zum einen durch Inaktivierung von Apoptosemechanismen erfolgen. Entsprechend wurden in Zellen die nur durch E1A immortalisiert/transformiert wurden, inaktivierende Mutationen in p53 beobachtet (White, 2001). Andererseits könnten Mutationen z.B. in Zellzykluskontrollgenen das Fortlaufen des Zellzyklus E1A-unabhängig machen, so dass eine Eliminierung des Proteins und des damit verbundenen Selektionsdrucks möglich wird. Durch dieses Modell kann somit auch erklärt werden, wieso BRK-Zelllinien die kein E1A mehr exprimieren ihren transformierten Status behalten (Nevels *et al.*, 2001; 5.4.3).

Auf welchen molekularen Grundlagen könnte aber nun die beobachtete Transformationsförderung durch E1B-156R beruhen? Zwei andere adenovirale Proteine, E4orf3 und E4orf6, fördern durch Induktion genomischer Instabilität, in Kooperation mit E1A eine Transformation nach dem „Hit & Run“-Prinzip (Nevels *et al.*, 2001). Daher wurde untersucht, ob auch E1B-156R zur Destabilisierung des Genoms beitragen kann. Die durchgeführten Studien zeigen, dass E1B-156R scheinbar das Auftreten poly- und aneuploider Zellen im Transformationsprozess fördert (5.4.3). Somit könnte E1B-156R tatsächlich durch Induktion oder Verstärkung von genomischer Instabilität zum Transformationsprozess beitragen.

Da ein starkes mutagenes Potenzial zwar einerseits die Akkumulation förderlicher Mutationen verursachen kann, andererseits aber nur schwer mit dem Zellüberleben vereinbar ist, wird nach dem Erwerb einiger transformationsfördernder Veränderungen wohl ein Selektionsdruck gegen die mutagenen Faktoren aufgebaut werden. Ein solches Szenario würde sich mit der Beobachtung decken, dass die Expression von E1A und E1B-156R in den transformierten Zelllinien teilweise nicht mehr nachweisbar ist (5.4.3).

6.2.3 E1B-156R kann p53 nicht wie E1B-55K inhibieren

Um die Mechanismen zu identifizieren, durch die E1B-156R zur Transformation beiträgt, wurden die Eigenschaften des Proteins mit denen des engverwandten Onkoproteins E1B-55K verglichen. Man geht heute davon aus, dass E1B-55K hauptsächlich durch Inhibition der p53-Funktion transformierend wirkt. Durch Koimmunpräzipitations-Experimente konnte hier nachgewiesen werden, dass neben E1B-55K auch E1B-156R in gewissem Umfang mit p53 interagiert (5.4.4). Die Interaktion ist jedoch im Vergleich zu der des Volllängenproteins deutlich verändert und wesentlich schwächer. E1B-156R scheint somit ebenfalls einen p53-Interaktionsbereich zu besitzen, wobei unklar ist, ob die beobachtete Wechselwirkung direkt oder indirekt ist. Die Beobachtung, dass E1B-156R, im Gegensatz zu E1B-55K, hauptsächlich mit einer und nicht mit zwei p53-Formen interagiert, könnte darauf hindeuten, dass Modifikationen am Tumorsuppressor die Affinität der beide E1B-Proteine unterschiedlich beeinflussen. So ist bekannt, dass E1B-55K innerhalb der 123

N-terminalen Aminosäurereste an p53 bindet (Kao *et al.*, 1990; Martin und Berk, 1998). Von besonderer Bedeutung für die Interaktion scheinen die Aminosäurereste 23-27 von p53 zu sein (Lin *et al.*, 1994). Interessanterweise sind einige dieser Reste auch Teil des Bereiches (Aminosäuren 18-26), der die Interaktion zwischen p53 und MDM2 vermittelt (Kussie *et al.*, 1996). In unmittelbarer Umgebung dieses Sequenzabschnitts befinden zahlreiche, für die Funktion des Tumorsuppressors wichtige, Phosphorylierungsstellen (zur Übersicht: Yang, 2005). Da bekannt ist, dass die Bindung zwischen p53 und MDM2 durch Phosphorylierung dieser Reste reguliert wird (Meek, 2002) ist denkbar, dass solche Modifikationen auch einen Einfluss auf die Interaktion mit E1B-55K oder E1B-156R haben könnten.

Diese Daten werfen nun die Frage auf, ob die schwache und veränderte Interaktion zwischen E1B-156R und p53 ausreichend ist, um die Funktionen des Tumorsuppressors zu inhibieren. Es ist sehr wahrscheinlich, dass eine Beeinflussung von p53 durch E1B-156R über Wege erfolgt, die auch von E1B-55K genutzt werden. Heute wird angenommen, dass E1B-55K p53 über zwei Mechanismen entgegenwirken kann: zum einen durch Relokalisation und Sequestration von p53 in zytoplasmatische Strukturen (Endter *et al.*, 2005; Hutton *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2003) und zum anderen durch Repression der p53-vermittelten Aktivierung proapoptischer und anti-proliferativer Gene (Martin und Berk, 1998; Martin und Berk, 1999; Teodoro und Branton, 1997; Yew und Berk, 1992; Yew *et al.*, 1994). E1B-156R hingegen kann weder die Lokalisation des Tumorsuppressors noch die p53-vermittelte Transaktivierung beeinflussen (5.4.4 & 5.4.5). Die Lokalisation von E1B-55K wird wohl hauptsächlich durch zwei Struktur motive beeinflusst (Abb. 2.5): ein Kernexportsignal (*nuclear export signal*, NES) (Endter *et al.*, 2005; Kratzer *et al.*, 2000) und ein SUMO1-(*small ubiquitin-related modifier 1*) Konjugationsmotiv (*sumo1 conjugation motif*, SCM) (Endter *et al.*, 2001). Keines dieser Motive ist in den E1BN-Proteinen enthalten. Dies ist wohl zumindest teilweise die Ursache der diffusen subzellulären Verteilung von E1B-156R und seiner Unfähigkeit p53 zu sequestrieren (Abb. 5.11 B und 5.17).

E1B-156R nutzt somit keine der bekannten p53-hemmenden Funktionen durch die E1B-55K zur Transformation beiträgt. Somit wird seine transformationsfördernde

Wirkung durch andere, noch aufzuklärende Mechanismen vermittelt. Die hier gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass diese wahrscheinlich p53-unabhängig sind. Da p53 jedoch neben seiner Rolle als Transkriptionsaktivator noch andere Funktionen erfüllt, kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass E1B-156R evtl. durch Inhibition solcher Mechanismen wirkt. So wurde vor kurzem beobachtet, dass p53 an die Mitochondrien lokalisieren kann, dort direkt mit Bcl-2-Proteinen interagiert und den intrinsischen Weg der Apoptose induziert (zur Übersicht: Yee und Vousden, 2005).

Gegen eine Hemmung von p53 durch E1B-156R spricht allerdings auch die Tatsache, dass in den E1B-156R-exprimierenden Zelllinien AB605 und AB606 scheinbar keine erhöhten p53-Mengen toleriert werden (Abb. 5.14). E1B-55K-exprimierenden Zellen (z.B. AB120) können hingegen trotz deutlich erhöhter p53-Mengen proliferieren, da das E1B-Protein den Funktionen des Tumorsuppressors effizient entgegenwirkt.

Aufgrund der engen Verwandtschaft von E1B-156R und E1B-55K, könnte eine durch das E1BN-Protein vermittelte transformationsfördernde Wirkung auch im Voll-längenprotein aktiv sein. Somit könnte eine Aufklärung dieser E1B-156R-Funktion auch Rückschlüsse auf noch unbekannte E1B-55K-Funktionen zulassen.

6.2.4 E1B-156R als potenzieller Transkriptionsrepressor

Die Fähigkeit von E1B-55K die p53-vermittelte Transaktivierung zu inhibieren wird durch eine C-terminale Transkriptionsrepressionsdomäne vermittelt, die auch in E1B-156R enthalten ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass E1B-156R die Transaktivierungsfunktion des Tumorsuppressors nicht inhibiert (5.4.5), obwohl es eine funktionale Transkriptionsrepressionsdomäne besitzt (5.4.6). Zwar sind neben p53 bisher keine weiteren Faktoren bekannt die durch E1B-55K reprimiert werden (Martin und Berk, 1998; Martin und Berk, 1999; Teodoro und Branton, 1997; Yew und Berk, 1992; Yew *et al.*, 1994), doch konnte gezeigt werden, dass die Funktion der Domäne nicht auf p53 beschränkt ist (Yew *et al.*, 1994). Daher ist denkbar, dass E1B-156R möglicherweise als Repressor anderer, noch nicht bestimmter Aktivatoren fungiert.

6.2.5 E1B-156R als Regulator der Transkriptionsrepression durch E1B-55K

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass E1B-156R die Repression der p53-vermittelten Transaktivierung durch E1B-55K dosisabhängig aufheben kann (5.4.8). Für die funktionelle Wechselwirkung der beiden E1B-Proteine sind verschiedene Mechanismen vorstellbar.

Zum einen könnte die Hemmung der E1B-55K-Funktion durch eine Kompetition um Kofaktoren vermittelt werden. So ist bekannt, dass E1B-55K zur Transkriptionsrepression einen bisher unbekanntem Korepressor benötigt (Martin und Berk, 1999) und es ist anzunehmen, dass derselbe Faktor auch von E1B-156R benötigt wird. Liegen beide E1B-Proteine gemeinsam vor, könnte die Menge des für E1B-55K verfügbaren Korepressors durch dessen Bindung an E1B-156R limitiert werden. Einschränkend ist jedoch zu sagen, dass ohne Kenntnis des Kofaktors nicht abgeschätzt werden kann, ob die exprimierten Mengen der E1B-Proteine ausreichend sind, um das zelluläre Reservoir des Faktors zu erschöpfen.

Zum anderen stellt aber auch eine Regulation von E1B-55K durch direkte Interaktion mit E1B-156R ein attraktives Modell dar. So ist bekannt, dass E1B-55K in der Zelle als Dimer vorliegt, wobei die für die Oligomerisierung verantwortlichen Bereiche bisher nicht näher beschrieben wurden (Martin und Berk, 1998). In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass E1B-156R mit sich selbst und auch mit E1B-55K interagiert (5.4.7). Dies lässt vermuten, dass E1B-156R zur Ausbildung von Homodimeren sowie von E1B-55K/E1B-156R-Heterodimeren fähig ist. Durch diese Daten lässt sich die Position des E1B-55K-Dimerisierungsbereiches auf die auch in E1B-156R enthaltenen C- und N-terminalen Bereiche eingrenzen. Es ist anzunehmen, dass solche Heterodimere eine veränderte Funktionalität im Vergleich zu E1B-55K-Homodimeren besitzen und dass ihre Bildung die Repression der p53-vermittelten Transaktivierung durch E1B-55K aufheben könnte (Abb. 5.21).

In weiteren Experimenten wurde überprüft, ob E1B-156R eine funktionale Transkriptionsrepressionsdomäne besitzen muss, um die Repressionsfunktion von E1B-55K zu inhibieren. Die Aktivität der Domäne ist von der Phosphorylierbarkeit dreier C-terminaler Reste abhängig (Teodoro und Branton, 1997; Teodoro *et al.*, 1994), die in E1B-55K und E1B-156R enthalten sind und in beiden Proteinen phosphoryliert

werden (Teodoro *et al.*, 1994). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass nicht-phosphorylierbares, inaktives E1B-156R die Repressionswirkung von E1B-55K nicht aufheben kann (Abb. 5.22). Diese Beobachtung, lässt vermuten, dass die Phosphorylierung der Transkriptionsrepressionsdomäne Voraussetzung für die Interaktion mit dem Korepressor und/oder die Oligomerisierung ist.

6.2.6 Denkbare Konsequenzen der E1B-156R/E4orf6-Interaktion

Während E1B-55K alleine nur zur Inhibition von p53 in der Lage ist, kann es in Kooperation mit dem adenoviralen E4orf6-Protein effizient den Abbau des Tumorsuppressors induzieren. Hierzu bilden die viralen Proteine mit zellulären Faktoren einen E3-Ubiquitin-Ligasekomplex der p53 ubiquitinyliert und dem proteasomalen Abbau zuführt (Blanchette *et al.*, 2004; Harada *et al.*, 2002; Querido *et al.*, 2001). Es wird heute vermutet, dass E1B-55K als Substratlieferant (z.B. p53 und Mre11) fungiert, während E4orf6 die zellulären Komponenten zu einem funktionalen Komplex zusammenführt (Blanchette *et al.*, 2004).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen, dass E1B-156R ebenfalls mit E4orf6 interagiert (Abb. 5.23). Da vermutet wird, dass E1B-55K nur an E4orf6 bindet, wenn dieses in den Ubiquitin-Ligasekomplex integriert ist (Blanchette *et al.*, 2004), könnte die Interaktion von E1B-156R mit E4orf6 auf die Existenz eines E1B-156R/E4orf6-Ubiquitin-Ligasekomplexes hinweisen. Ein Abbau von p53 durch einen solchen potenziellen Komplex konnte jedoch nicht gezeigt werden (Abb. 5.23). Dies weist erneut darauf hin, dass die eingeschränkte Interaktion zwischen E1B-156R und dem Tumorsuppressor wohl nicht ausreichend ist, um p53 entgegenzuwirken.

Auch bleibt ein potenzieller E1B-156R/E4orf6-Ubiquitin-Ligasekomplex ohne ein identifiziertes Zielprotein rein spekulativ. Es ist jedoch möglich, dass solche Zielproteine in Zukunft gefunden werden können. So wurden nach p53 bereits Mre11 und DNA-Ligase IV als weitere Substrate der E1B-55K/E4orf6-Ubiquitin-Ligase identifiziert und das Beispiel des HPV (*human papillomavirus*) E6-Proteins zeigt, die mögliche Potenz viraler Ubiquitinligasen (Baker *et al.*, 2007; Stracker *et al.*, 2002). So, ist heute bekannt, dass der HPV E6-enthaltende E3-Ubiquitin-Ligasekomplex den

Abbau einer Vielzahl zellulärer Faktoren induziert (Massimi *et al.*, 2008; Munger und Howley, 2002).

6.2.7 E4orf6- und p53-Interaktionsbereiche in E1B-156R und E1B-55K

Die beobachteten Interaktionen von E1B-156R mit p53 und E4orf6 waren überraschend, da der Bereich, der in E1B-55K die Bindung dieser Proteine vermitteln soll, nicht in E1B-156R enthalten ist (Rubenwolf *et al.*, 1997; Yew und Berk, 1992). Da E1B-156R nur aus dem N- und dem C-Terminus von E1B-55K besteht, sollten in ihm enthaltene Interaktionsbereiche wahrscheinlich auch im Volllängenprotein zu finden sein. Dies würde die Existenz je zweier unterschiedlicher Interaktionsbereiche für E4orf6 und zweier für p53 in E1B-55K bedeuten.

Daneben ist jedoch auch eine andere Erklärung vorstellbar. So wurde der Bindungsbereich im Zentralteil des Volllängenproteins mit Hilfe mutierter E1B-Proteine identifiziert, die die entsprechenden Interaktoren nicht mehr binden konnten (Rubenwolf *et al.*, 1997; Yew und Berk, 1992). Für einige der hierbei verwendeten Proteine wurde außerdem eine Inaktivierung der C-terminalen Transkriptionsrepressionsdomäne von E1B-55K gezeigt (Yew *et al.*, 1994). Es wird daher spekuliert, dass Mutationen im Zentralteil von E1B-55K die Tertiärstruktur des Proteins beeinträchtigen und sich so allgemein auf die Ausbildung von Interaktionen und die Aktivität des Proteins auswirken können (Rubenwolf *et al.*, 1997; Yew *et al.*, 1994). Somit ist denkbar, dass anstelle zweier p53- und zweier E4orf6-Interaktionsstellen nur je eine Stelle existiert, die in den Proteinbereichen lokalisiert ist, die auch in E1B-156R enthalten sind. Auch würde dies implizieren, dass der Zentralteil von E1B-55K von genereller Wichtigkeit für Stabilität und/oder Konformation des Proteins ist.

Es sollte darauf hingewiesen werden, dass aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht entschieden werden kann, ob die Interaktion von E1B-156R mit p53 und E4orf6 direkt oder indirekt erfolgt.

6.2.8 Hinweise auf alternative Mechanismen zur Transformationsförderung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass E1B-156R transformationsförderndes Potenzial besitzt (5.4.1) und dass diese Wirkung unabhängig von der Repression der p53-vermittelten Transaktivierung (5.4.5) und der Sequestration des Tumorsuppressors ist (5.4.4). Zukünftige Studien werden die Frage klären müssen, über welche alternativen Mechanismen E1B-156R zur Transformation beiträgt. Doch bereits jetzt konnten Anhaltspunkte gesammelt werden, die zur Aufklärung beitragen können.

So wurde hier untersucht, ob E1B-156R mit einigen bekannten zellulären Bindungspartnern von E1B-55K interagieren kann, deren Modulation sich positiv auf die Transformation auswirken könnte.

Ein solcher Interaktionspartner war Mre11. Dieses Protein ist Teil des zellulären MRN- (Mre11/Rad50/NBS1-) Komplexes, der als DNA-Schadenssensor fungiert und an der DNA-Reparatur, dem Erhalt der Telomerenden sowie der Zellzykluskontrolle beteiligt ist (zur Übersicht: Assenmacher und Hopfner, 2004). E1B-55K bindet, sequestriert und inaktiviert Mre11 (Carson *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005; Stracker *et al.*, 2002) und es gibt einige Hinweise darauf, dass diese Aktivität zum transformationsfördernden Potenzial von E1B-55K beiträgt (Härtl *et al.*, 2008). Ein Szenario nachdem E1B-156R vielleicht auf ähnlichem Wege wirken könnte, ließ sich jedoch nicht bestätigen, da keine Interaktion zwischen Mre11 und dem E1BN-Protein nachweisbar war (Abb. 5.24).

Ein anderer ausgewählter E1B-55K-Interaktionspartner ist der zelluläre Apoptose-regulator Daxx. Das Protein bindet direkt an den C-Terminus der E1B-55K-Proteine von Ad2, Ad5 und Ad12 (Zhao *et al.*, 2003). In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass es auch mit Ad5 E1B-156R interagiert (Abb. 5.25).

Bisher existiert noch kein einheitliches Bild der verschiedenen Daxx-vermittelten Funktionen und dem Protein wurden sowohl pro-apoptotische als auch anti-apoptotische Aktivitäten zugeschrieben (zur Übersicht: Norbury und Zhivotovsky, 2004; Salomoni und Khelifi, 2006). Auch scheint es antivirale Funktionen zu erfüllen. So wurde gezeigt, dass Daxx durch Repression des *major immediate early* Promotors die Replikation von humanen Zytomegalieviren hemmen kann (Tavalai *et al.*, 2008).

Auch wirkt es durch direkte Interaktion mit verschiedenen DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren – inklusive p53 – reprimierend oder aktivierend auf die Transkription verschiedener Gene ein (Emelyanov *et al.*, 2002; Hollenbach *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2000a; Li *et al.*, 2000b; Ohiro *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2003). Neben seiner transkriptionsmodulatorischen Funktionen scheint Daxx auch bei der Modifikation verschiedener zellulärer Faktoren eine Rolle zu spielen. So wurde berichtet, dass das Protein in die Regulation der MDM2-Ubiquitylierung und in die Phosphorylierung von p53 eingreift (Li *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2006). Daneben scheint Daxx, an der Vermittlung der JNK (c-Jun N-terminale Kinase) -induzierten Apoptose in Folge von DNA-Schäden beteiligt zu sein (Khelifi *et al.*, 2005).

Es ist aufgrund dieser komplexen, bisher nur teilweise verstandenen Vorgänge schwierig die Auswirkungen einer möglichen Inhibition von Daxx durch E1B-156R vorherzusehen. Ein denkbare Szenario ergibt sich allerdings aus der Beobachtung, dass Daxx durch Interaktion mit HIPK2 (*homeodomain-interacting protein kinase 2*) die Phosphorylierung von p53 an Position Ser46 fördert (Li *et al.*, 2007). Diese Modifikation scheint die Reaktion auf DNA-Schäden maßgeblich zu beeinflussen und zur Induktion von Apoptose anstelle von Zellzyklusarrest zu führen (Dauth *et al.*, 2007; Mayo *et al.*, 2005). Tatsächlich wurde gezeigt, dass Daxx die Aktivierung einiger p53-regulierter pro-apoptotischer Gene fördern kann, während Gene die Zellzyklusarrest vermitteln eher gehemmt werden. Entsprechend sensibilisiert eine Daxx-Überexpression die Zellen auch für die Apoptoseinduktion (Gostissa *et al.*, 2004). Die Grundlage der unterschiedlichen Beeinflussung verschiedener Gene ist noch unklar, es wird jedoch vermutet, dass die genaue Beschaffenheit des jeweiligen Promotors entscheidend sein könnte (Gostissa *et al.*, 2004).

E1B-156R könnte durch seine Interaktion mit Daxx die Serin 46-Phosphorylierung unterdrücken und so dazu beitragen, dass auch nach schweren DNA-Schäden keine Apoptose sondern Zellzyklusarrest induziert wird. In Kombination mit den Zellzyklus-aktivierenden Funktionen von E1A sollte dies auch Zellen mit instabilem Genom ein Überleben und Proliferation ermöglichen. Somit könnte das transformationsfördernde Potenzial von E1B-156R unter Auftreten verstärkter genomischer Instabilität durch Interaktion mit Daxx erklärt werden. Da auch E1B-55K in der Lage ist mit Daxx zu interagieren (Zhao *et al.*, 2003) ist ferner denkbar,

dass der vorgeschlagene Mechanismus auch zum Funktionsspektrum des Voll-längenproteins beitragen könnte.

Die Frage welche Rolle die Interaktion zwischen Daxx und E1B-156R bzw. E1B-55K in der produktiven Infektion spielt, kann heute noch nicht klar beantwortet werden. Es ist jedoch denkbar, dass auch hier die Hemmung von Apoptosemechanismen von Bedeutung ist. Außerdem könnte Daxx - ähnlich wie beim humanen Zytomegalievirus (Tavalai *et al.*, 2008) - die frühe Genexpression der Adenoviren hemmen, sofern es nicht durch geeignete virale Faktoren inaktiviert wird.

6.3 Ausblick

In dieser Arbeit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die E1BN-Proteine von Ad5 funktional sind. Tatsächlich weisen *in vitro*-Experimente und die mit den Virusmutanten gemachten Beobachtungen darauf hin, dass alle drei E1BN-Proteine eine Rolle in Infektion und/oder Transformation spielen. Die Tatsache, dass bei diversen humanen Adenoviren Hinweise auf die Bildung von E1BN-Proteinen gefunden wurden (2.3.3) lässt darüber hinaus vermuten, dass diese Funktionen konserviert und wichtig sind.

Auch konnten erste Hinweise auf die Natur der E1BN-Funktionen - insbesondere von E1B-156R - gefunden werden. Die vorliegende Arbeit erweitert daher das Spektrum der E1B-Proteine um drei potenziell wichtige Faktoren und dient als Grundlage für weiterführende Studien zur detaillierten Aufklärung der E1B-Funktionen in Infektion und Transformation. Zukünftige Arbeiten sollen helfen die molekularen Grundlagen der hier beobachteten Effekte aufzuklären und einen besseren Einblick in die Wechselwirkungen zwischen Adenoviren und Wirtszellen zu gewinnen. Hierzu sollen unter anderem durch *Yeast-2-Hybrid*-Analysen weitere zelluläre Interaktionspartner der E1BN-Proteine identifiziert werden.

Von besonderem Interesse ist auch die Beantwortung der Frage, ob und wie die Interaktion von E1B-156R mit Daxx transformationsfördernd wirken kann, da dies zur Identifizierung neuer Mechanismen der Adenovirus-vermittelten Transformation und zum besseren Verständnis allgemeiner onkogener Prozesse führen

könnte. In diesem Zusammenhang soll außerdem durch genauere Untersuchung der auftretenden genetischen Veränderungen (z. B. mittels *Multicolor-FISH*-Analysen) bestimmt werden, wie E1B-156R zur Entstehung genomischer Instabilität beitragen kann. Auch eine umfassende Analyse der physikalischen und funktionellen Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen E1BN-Proteinen und E1B-55K könnte das Verständnis der Abläufe bei der adenoviralen Infektion und Transformation wesentlich verbessern.

If I have been able to see further, it is because I have stood on the Shoulders of Giants

Sir Isaac Newton, Physiker und Astronom

- Abken H, Butzler C, Willecke K (1987). Adenovirus type 5 persisting in human lymphocytes is unlikely to be involved in immortalization of lymphoid cells by fusion with cytoplasts or by transfection with DNA of mouse L cells. *Anticancer Res* **7**: 553-8.
- Akagi T (2004). Oncogenic transformation of human cells: shortcomings of rodent model systems. *Trends Mol Med* **10**: 542-8.
- Allard A, Wadell G (1992). The E1B transcription map of the enteric adenovirus type 41. *Virology* **188**: 319-30.
- Ambinder RF (2000). Gammaherpesviruses and "Hit-and-Run" oncogenesis. *Am J Pathol* **156**: 1-3.
- Anderson CW, Baum PR, Gesteland RF (1973). Processing of adenovirus 2-induced proteins. *J Virol* **12**: 241-52.
- Anderson CW, Schmitt RC, Smart JE, Lewis JB (1984). Early region 1B of adenovirus 2 encodes two coterminal proteins of 495 and 155 amino acid residues. *J Virol* **50**: 387-96.
- Anderson GR (2001). Genomic instability in cancer. *Curr Sci* **81**: 501-507.
- Ankerst J, Christensen P, Kjellen L, Kronvall G (1974a). A routine diagnostic test for IgA and IgM antibodies to rubella virus: absorption of IgG with *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* **130**: 268-73.
- Ankerst J, Jonsson N (1989). Adenovirus type 9-induced tumorigenesis in the rat mammary gland related to sex hormonal state. *J Natl Cancer Inst* **81**: 294-8.
- Ankerst J, Steele G, Jr., Sjogren HO (1974b). Cross-reacting tumor-associated antigen(s) of adenovirus type 9-induced fibroadenomas and a chemically induced mammary carcinoma in rats. *Cancer Res* **34**: 1794-800.
- Armentano D, Sookdeo CC, Hehir KM, Gregory RJ, St George JA, Prince GA, Wadsworth SC, Smith AE (1995). Characterization of an adenovirus gene transfer vector containing an E4 deletion. *Hum Gene Ther* **6**: 1343-53.
- Assenmacher N, Hopfner KP (2004). MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. *Chromosoma* **113**: 157-66.
- Babiss LE, Ginsberg HS (1984). Adenovirus type 5 early region 1b gene product is required for efficient shutoff of host protein synthesis. *J Virol* **50**: 202-12.
- Babiss LE, Ginsberg HS, Darnell JE, Jr. (1985). Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport. *Mol Cell Biol* **5**: 2552-8.
- Bailey A, MacKay N, Mautner V (1993). Enteric adenovirus type 40: expression of E1B proteins in vitro and in vivo. *Virology* **193**: 631-41.
- Baker A, Rohleder KJ, Hanakahi LA, Ketner G (2007). Adenovirus E4 34k and E1b 55k oncoproteins target host DNA ligase IV for proteasomal degradation. *J Virol* **81**: 7034-40.
- Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B (1990). Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* **249**: 912-5.
- Barbanti-Brodano G, Sabbioni S, Martini F, Negrini M, Corallini A, Tognon M (2004). Simian virus 40 infection in humans and association with human diseases: results and hypotheses. *Virology* **318**: 1-9.

- Barker DD, Berk AJ (1987). Adenovirus proteins from both E1B reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection. *Virology* **156**: 107-21.
- Beck KF, Stathopoulos I, Berninger MG, Schweizer M (1993). Overcoming GC compression in nucleotide sequencing. *Biotechniques* **14**: 375.
- Beltz GA, Flint SJ (1979). Inhibition of HeLa cell protein synthesis during adenovirus infection. Restriction of cellular messenger RNA sequences to the nucleus. *J Mol Biol* **131**: 353-73.
- Benko M, Elo P, Ursu K, Ahne W, LaPatra SE, Thomson D, Harrach B (2002). First molecular evidence for the existence of distinct fish and snake adenoviruses. *J Virol* **76**: 10056-9.
- Berk AJ (2005). Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene* **24**: 7673-85.
- Berk AJ (2007). *Adenoviridae: The viruses and their replication*, 5 edn. Raven Press: New York, N. Y.
- Blair Zajdel ME, Blair GE (1988). The intracellular distribution of the transformation-associated protein p53 in adenovirus-transformed rodent cells. *Oncogene* **2**: 579-84.
- Blanchette P, Cheng CY, Yan Q, Ketner G, Ornelles DA, Dobner T, Conaway RC, Conaway JW, Branton PE (2004). Both BC-box motifs of adenovirus protein E4orf6 are required to efficiently assemble an E3 ligase complex that degrades p53. *Mol Cell Biol* **24**: 9619-29.
- Blanchette P, Kindsmüller K, Groitl P, Dallaire F, Speiseder T, Branton PE, Dobner T (2008). Control of mRNA export by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins during productive infection requires E4orf6 ubiquitin ligase activity. *J Virol* **82**: 2642-51.
- Boivin D, Morrison MR, Marcellus RC, Querido E, Branton PE (1999). Analysis of synthesis, stability, phosphorylation, and interacting polypeptides of the 34-kilodalton product of open reading frame 6 of the early region 4 protein of human adenovirus type 5. *J Virol* **73**: 1245-53.
- Bos JL, Polder LJ, Bernards R, Schrier PI, van den Elsen PJ, van der Eb AJ, van Ormondt H (1981). The 2.2 kb E1b mRNA of human Ad12 and Ad5 codes for two tumor antigens starting at different AUG triplets. *Cell* **27**: 121-31.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Brunak S, Engelbrecht J, Knudsen S (1991). Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *J Mol Biol* **220**: 49-65.
- Brusca JS, Jannun R, Chinnadurai G (1984). Efficient transformation of rat 3Y1 cells by human adenovirus type 9. *Virology* **136**: 328-37.
- Bullock WO, Fernandez JM, Short JM (1987). *XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with b-galactosidase selection*.
- Burgert HG, Ruzsics Z, Obermeier S, Hilgendorf A, Windheim M, Elsing A (2002). Subversion of host defense mechanisms by adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **269**: 273-318.
- Caporossi D, Bacchetti S (1990). Definition of adenovirus type 5 functions involved in the induction of chromosomal aberrations in human cells. *J Gen Virol* **71 (Pt 4)**: 801-8.
- Carson CT, Schwartz RA, Stracker TH, Lilley CE, Lee DV, Weitzman MD (2003). The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. *Embo J* **22**: 6610-20.
- CDC (2007). Acute respiratory disease associated with adenovirus serotype 14--four states, 2006-2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **56**: 1181-4.
- Chastain-Moore AM, Roberts T, Trott DA, Newbold RF, Ornelles DA (2003). An activity associated with human chromosome 21 permits nuclear colocalization of the adenovirus E1B-55K and E4orf6 proteins and promotes viral late gene expression. *J Virol* **77**: 8087-98.

- Chauvin C, Suh M, Remy C, Benabid AL (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**: 347-57.
- Cheng H, Dufu K, Lee CS, Hsu JL, Dias A, Reed R (2006). Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA. *Cell* **127**: 1389-400.
- Chow LT, Broker TR, Lewis JB (1979). Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus-2. *J Mol Biol* **134**: 265-303.
- Collot-Teixeira S, Bass J, Denis F, Ranger-Rogez S (2004). Human tumor suppressor p53 and DNA viruses. *Rev Med Virol* **14**: 301-19.
- Cook JL, Lewis AM, Jr. (1987). Immunological surveillance against DNA-virus-transformed cells: correlations between natural killer cell cytolytic competence and tumor susceptibility of athymic rodents. *J Virol* **61**: 2155-61.
- Cuconati A, White E (2002). Viral homologs of BCL-2: role of apoptosis in the regulation of virus infection. *Genes Dev* **16**: 2465-78.
- Cutt JR, Shenk T, Hearing P (1987). Analysis of adenovirus early region 4-encoded polypeptides synthesized in productively infected cells. *J Virol* **61**: 543-52.
- Dauth I, Kruger J, Hofmann TG (2007). Homeodomain-interacting protein kinase 2 is the ionizing radiation-activated p53 serine 46 kinase and is regulated by ATM. *Cancer Res* **67**: 2274-9.
- Davison AJ, Benko M, Harrach B (2003). Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol* **84**: 2895-908.
- De Luca A, Mangiacasale R, Severino A, Malquori L, Baldi A, Palena A, Mileo AM, Lavia P, Paggi MG (2003). E1A deregulates the centrosome cycle in a Ran GTPase-dependent manner. *Cancer Res* **63**: 1430-7.
- Debbas M, White E (1993). Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev* **7**: 546-54.
- Dewey CN, Rogozin IB, Koonin EV (2006). Compensatory relationship between splice sites and exonic splicing signals depending on the length of vertebrate introns. *BMC Genomics* **7**: 311.
- Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* **11**: 1475-89.
- Dijkema R, Dekker BM, van Ormondt H (1982). Gene organization of the transforming region of adenovirus type 7 DNA. *Gene* **18**: 143-56.
- Dobner T, Horikoshi N, Rubenwolf S, Shenk T (1996). Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor. *Science* **272**: 1470-3.
- Dobner T, Kzhyshkowska J (2001). Nuclear export of adenovirus RNA. *Curr Top Microbiol Immunol* **259**: 25-54.
- Dosch T, Horn F, Schneider G, Kratzer F, Dobner T, Hauber J, Stauber RH (2001). The adenovirus type 5 E1B-55K oncoprotein actively shuttles in virus-infected cells, whereas transport of E4orf6 is mediated by a CRM1-independent mechanism. *J Virol* **75**: 5677-83.
- Drews RE, Chan VT, Schnipper LE (1992). Oncogenes result in genomic alterations that activate a transcriptionally silent, dominantly selectable reporter gene (neo). *Mol Cell Biol* **12**: 198-206.
- Dyson N, Harlow E (1992). Adenovirus E1A targets key regulators of cell proliferation. *Cancer Surv* **12**: 161-95.
- Elgui de Oliveira D (2007). DNA viruses in human cancer: an integrated overview on fundamental mechanisms of viral carcinogenesis. *Cancer Lett* **247**: 182-96.
- Emelyanov AV, Kovac CR, Sepulveda MA, Birshtein BK (2002). The interaction of Pax5 (BSAP) with Daxx can result in transcriptional activation in B cells. *J Biol Chem* **277**: 11156-64.

- Endter C, Dobner T (2004). Cell transformation by human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **273**: 163-214.
- Endter C, Hartl B, Spruss T, Hauber J, Dobner T (2005). Blockage of CRM1-dependent nuclear export of the adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa protein augments oncogenic transformation of primary rat cells. *Oncogene* **24**: 55-64.
- Endter C, Kzhyshkowska J, Stauber R, 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**: 11312-7.
- Fallaux FJ, Bout A, van der Velde I, van den Wollenberg DJ, Hehir KM, Keegan J, Auger C, Cramer SJ, van Ormondt H, van der Eb AJ, Valerio D, Hoeben RC (1998). New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther* **9**: 1909-17.
- Fallaux FJ, Kranenburg O, Cramer SJ, Houweling A, Van Ormondt H, Hoeben RC, Van Der Eb AJ (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**: 215-22.
- Farina SF, Gao GP, Xiang ZQ, Rux JJ, Burnett RM, Alvira MR, Marsh J, Ertl HC, Wilson JM (2001). Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus. *J Virol* **75**: 11603-13.
- Fessler SP, Delgado-Lopez F, Horwitz MS (2004). Mechanisms of E3 modulation of immune and inflammatory responses. *Curr Top Microbiol Immunol* **273**: 113-35.
- Fessler SP, Young CS (1999). The role of the L4 33K gene in adenovirus infection. *Virology* **263**: 507-16.
- Flint SJ, Gonzalez RA (2003). Regulation of mRNA production by the adenoviral E1B 55-kDa and E4 Orf6 proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* **272**: 287-330.
- Fox JP, Hall CE, Cooney MK (1977). The Seattle Virus Watch. VII. Observations of adenovirus infections. *Am J Epidemiol* **105**: 362-86.
- Gabler S, Schutt H, Groitl P, Wolf H, Shenk T, 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**: 7960-71.
- Garnett CT, Erdman D, Xu W, Gooding LR (2002). Prevalence and quantitation of species C adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes. *J Virol* **76**: 10608-16.
- Gatza ML, Chandhasin C, Ducu RI, Marriott SJ (2005). Impact of transforming viruses on cellular mutagenesis, genome stability, and cellular transformation. *Environ Mol Mutagen* **45**: 304-25.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* **51**: 1417-23.
- Gingeras TR, Sciaky D, Gelinas RE, Bing-Dong J, Yen CE, Kelly MM, Bullock PA, Parsons BL, O'Neill KE, Roberts RJ (1982). Nucleotide sequences from the adenovirus-2 genome. *J Biol Chem* **257**: 13475-91.
- Gonzalez RA, Flint SJ (2002). Effects of mutations in the adenoviral E1B 55-kilodalton protein coding sequence on viral late mRNA metabolism. *J Virol* **76**: 4507-19.
- Goodrum FD, Shenk T, Ornelles DA (1996). Adenovirus early region 4 34-kilodalton protein directs the nuclear localization of the early region 1B 55-kilodalton protein in primate cells. *J Virol* **70**: 6323-35.
- Gostissa M, Morelli M, Mantovani F, Guida E, Piazza S, Collavin L, Brancolini C, Schneider C, Del Sal G (2004). The transcriptional repressor hDaxx potentiates p53-dependent apoptosis. *J Biol Chem* **279**: 48013-23.
- Graham FL (1984). *Transformation by and oncogenicity of human adenoviruses*. Plenum Press: New York, N.Y.

- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**: 59-74.
- Grand RJ, Grant ML, Gallimore PH (1994). Enhanced expression of p53 in human cells infected with mutant adenoviruses. *Virology* **203**: 229-40.
- Grand RJ, Lecane PS, Owen D, Grant ML, Roberts S, Levine AJ, Gallimore PH (1995). The high levels of p53 present in adenovirus early region 1-transformed human cells do not cause up-regulation of MDM2 expression. *Virology* **210**: 323-34.
- Graveley BR (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *Rna* **6**: 1197-211.
- Green M, Brackmann KH, Cartas MA, Matsuo T (1982). Identification and purification of a protein encoded by the human adenovirus type 2 transforming region. *J Virol* **42**: 30-41.
- Groitel P, Dobner T (2007). Construction of adenovirus type 5 early region 1 and 4 virus mutants. *Methods Mol Med* **130**: 29-39.
- Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J (2008). An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* **319**: 1352-5.
- Halbert DN, Cutt JR, Shenk T (1985). Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *J Virol* **56**: 250-7.
- Hanahan D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-80.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.
- Harada JN, Berk AJ (1999). p53-Independent and -dependent requirements for E1B-55K in adenovirus type 5 replication. *J Virol* **73**: 5333-44.
- Harada JN, Shevchenko A, Shevchenko A, Pallas DC, Berk AJ (2002). Analysis of the adenovirus E1B-55K-anchored proteome reveals its link to ubiquitination machinery. *J Virol* **76**: 9194-206.
- Harlow E, Franza BR, Jr., Schley C (1985). Monoclonal antibodies specific for adenovirus early region 1A proteins: extensive heterogeneity in early region 1A products. *J Virol* **55**: 533-46.
- Harlow E, Lane DP (1988). *Antibodies, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor: New York.
- Härtl B, Zeller T, Blanchette P, Kremmer E, Dobner T (2008). Adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa oncoprotein can promote cell transformation by a mechanism independent from blocking p53-activated transcription. *Oncogene*.
- Heng HH, Stevens JB, Liu G, Bremer SW, Ye KJ, Reddy PV, Wu GS, Wang YA, Tainsky MA, Ye CJ (2006). Stochastic cancer progression driven by non-clonal chromosome aberrations. *J Cell Physiol* **208**: 461-72.
- Hessein M, Saad el G, Mohamed AA, Kamel el AM, Abdel Hady AM, Amina M, Rogler CE (2005). Hit-and-run mechanism of HBV-mediated progression to hepatocellular carcinoma. *Tumori* **91**: 241-7.
- Hilleman MR, Werner JH (1954). Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med* **85**: 183-8.
- Hillis WD, Cooper MR, Bang FB (1973). Adenovirus infections in West Bengal. I. Persistence of viruses in infants and young children. *Indian J Med Res* **61**: 980-8.
- Hohlweg U, Dorn A, Hosel M, Webb D, Buettner R, Doerfler W (2004). Tumorigenesis by adenovirus type 12 in newborn Syrian hamsters. *Curr Top Microbiol Immunol* **273**: 215-44.
- Hollenbach AD, Sublett JE, McPherson CJ, Grosveld G (1999). The Pax3-FKHR oncoprotein is unresponsive to the Pax3-associated repressor hDaxx. *Embo J* **18**: 3702-11.
- Hong S, Paulson QX, Johnson DG (2008). E2F1 and E2F3 activate ATM through distinct mechanisms to promote E1A-induced apoptosis. *Cell Cycle* **7**: 391-400.
- Hopfner KP, Putnam CD, Tainer JA (2002). DNA double-strand break repair from head to tail. *Curr Opin Struct Biol* **12**: 115-22.
- Horne RW, Bonner S, Waterson AP, Wildy P (1959). The icosahedral form of an adenovirus. *J Mol Biol*: 84-86.

- Horvath J, Palkonyay L, Weber J (1986). Group C adenovirus DNA sequences in human lymphoid cells. *J Virol* **59**: 189-92.
- Horwitz MS (2001). Adenovirus immunoregulatory genes and their cellular targets. *Virology* **279**: 1-8.
- Horwitz MS (2004). Function of adenovirus E3 proteins and their interactions with immunoregulatory cell proteins. *J Gene Med* **6 Suppl 1**: S172-83.
- Huang L, Snyder AR, Morgan WF (2003). Radiation-induced genomic instability and its implications for radiation carcinogenesis. *Oncogene* **22**: 5848-54.
- Hui J, Bindereif A (2005). Alternative pre-mRNA splicing in the human system: unexpected role of repetitive sequences as regulatory elements. *Biol Chem* **386**: 1265-71.
- Hutton FG, Turnell AS, Gallimore PH, Grand RJ (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**: 452-62.
- Isken O, Maquat LE (2007). Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev* **21**: 1833-56.
- Iwasaka T, Hayashi Y, Yokoyama M, Hara K, Matsuo N, Sugimori H (1992). 'Hit and run' oncogenesis by human papillomavirus type 18 DNA. *Acta Obstet Gynecol Scand* **71**: 219-23.
- Izaurrealde E, Mattaj IW (1995). RNA export. *Cell* **81**: 153-9.
- Jakoby WB, Pastan IH (1979). *Cell culture*. Academic press, Inc.: San Diego, California.
- Javier R, Raska K, Jr., Macdonald GJ, Shenk T (1991). Human adenovirus type 9-induced rat mammary tumors. *J Virol* **65**: 3192-202.
- Javier R, Raska K, Jr., Shenk T (1992). Requirement for the adenovirus type 9 E4 region in production of mammary tumors. *Science* **257**: 1267-71.
- Jones MS, 2nd, Harrach B, Ganac RD, Gozum MM, Dela Cruz WP, Riedel B, Pan C, Delwart EL, Schnurr DP (2007). New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J Virol* **81**: 5978-84.
- Jones N, Shenk T (1979). Isolation of adenovirus type 5 host range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cells. *Cell* **17**: 683-9.
- Jonsson N, Ankerst J (1977). Studies on adenovirus type 9-induced mammary fibroadenomas in rats and their malignant transformation. *Cancer* **39**: 2513-9.
- Kalnina Z, Zayakin P, Silina K, Line A (2005). Alterations of pre-mRNA splicing in cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **42**: 342-57.
- Kao CC, Yew PR, Berk AJ (1990). Domains required for in vitro association between the cellular p53 and the adenovirus 2 E1B 55K proteins. *Virology* **179**: 806-14.
- Ketner G, Bridge E, Virtanen A, Hemstrom C, Pettersson U (1989). Complementation of adenovirus E4 mutants by transient expression of E4 cDNA and deletion plasmids. *Nucleic Acids Res* **17**: 3037-48.
- Khalili K, Del Valle L, Otte J, Weaver M, Gordon J (2003). Human neurotropic polyomavirus, JCV, and its role in carcinogenesis. *Oncogene* **22**: 5181-91.
- Khelifi AF, D'Alcontres MS, Salomoni P (2005). Daxx is required for stress-induced cell death and JNK activation. *Cell Death Differ* **12**: 724-33.
- Kim EJ, Park JS, Um SJ (2003). Identification of Daxx interacting with p73, one of the p53 family, and its regulation of p53 activity by competitive interaction with PML. *Nucleic Acids Res* **31**: 5356-67.
- Kindsmüller K, Groitl P, Härtl B, Blanchette P, Hauber J, Dobner T (2007). Intranuclear targeting and nuclear export of the adenovirus E1B-55K protein are regulated by SUMO1 conjugation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 6684-9.
- Kosulin K, Haberler C, Hainfellner JA, Amann G, Lang S, Lion T (2007). Investigation of adenovirus occurrence in pediatric tumor entities. *J Virol* **81**: 7629-35.

- Kralovicova J, Vorechovsky I (2007). Global control of aberrant splice-site activation by auxiliary splicing sequences: evidence for a gradient in exon and intron definition. *Nucleic Acids Res* **35**: 6399-413.
- Kratzer F, Rosorius O, Heger P, Hirschmann N, Dobner T, Hauber J, Stauber RH (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**: 850-7.
- Kuhlmann I, Achten S, Rudolph R, Doerfler W (1982). Tumor induction by human adenovirus type 12 in hamsters: loss of the viral genome from adenovirus type 12-induced tumor cells is compatible with tumor formation. *Embo J* **1**: 79-86.
- Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ, Pavletich NP (1996). Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* **274**: 948-53.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.
- Lane DP (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**: 15-6.
- Lauer KP, Llorente I, Blair E, Seto J, Krasnov V, Purkayastha A, Ditty SE, Hadfield TL, Buck C, Tibbetts C, Seto D (2004). Natural variation among human adenoviruses: genome sequence and annotation of human adenovirus serotype 1. *J Gen Virol* **85**: 2615-25.
- Lavia P, Mileo AM, Giordano A, Paggi MG (2003). Emerging roles of DNA tumor viruses in cell proliferation: new insights into genomic instability. *Oncogene* **22**: 6508-16.
- Leppard KN, Shenk T (1989). The adenovirus E1B 55 kd protein influences mRNA transport via an intranuclear effect on RNA metabolism. *Embo J* **8**: 2329-36.
- Levinson A, Levine AJ (1977). The isolation and identification of the adenovirus group C tumor antigens. *Virology* **76**: 1-11.
- Lewis JB, Anderson CW (1987). Identification of adenovirus type 2 early region 1B proteins that share the same amino terminus as do the 495R and 155R proteins. *J Virol* **61**: 3879-88.
- Li H, Leo C, Zhu J, Wu X, O'Neil J, Park EJ, Chen JD (2000a). Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Mol Cell Biol* **20**: 1784-96.
- Li Q, Wang X, Wu X, Rui Y, Liu W, Wang J, Wang X, Liou YC, Ye Z, Lin SC (2007). Daxx cooperates with the Axin/HIPK2/p53 complex to induce cell death. *Cancer Res* **67**: 66-74.
- Li R, Pei H, Watson DK, Papas TS (2000b). EAP1/Daxx interacts with ETS1 and represses transcriptional activation of ETS1 target genes. *Oncogene* **19**: 745-53.
- Li SS (2005). Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J* **390**: 641-53.
- Liang SH, Clarke MF (2001). Regulation of p53 localization. *Eur J Biochem* **268**: 2779-83.
- Lichtenstein DL, Toth K, Doronin K, Tollefson AE, Wold WS (2004). Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins. *Int Rev Immunol* **23**: 75-111.
- Lim LP, Burge CB (2001). A computational analysis of sequence features involved in recognition of short introns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 11193-8.
- Lin J, Chen J, Elenbaas B, Levine AJ (1994). Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein. *Genes Dev* **8**: 1235-46.
- Liu Y, Shevchenko A, Shevchenko A, Berk AJ (2005). Adenovirus exploits the cellular aggresome response to accelerate inactivation of the MRN complex. *J Virol* **79**: 14004-16.
- Loeb LA (1991). Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* **51**: 3075-9.
- Lomonte P, Morency E (2007). Centromeric protein CENP-B proteasomal degradation induced by the viral protein ICP0. *FEBS Lett* **581**: 658-62.
- Lowe SW, Ruley HE (1993). Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev* **7**: 535-45.

- Lucher LA, Brackmann KH, Symington JS, Green M (1984). Antibody directed to a synthetic peptide encoding the NH₂-terminal 16 amino acids of the adenovirus type 2 E1B-53K tumor antigen recognizes the E1B-20K tumor antigen. *Virology* **132**: 217-21.
- Lutz P, Kedinger C (1996). Properties of the adenovirus IVa2 gene product, an effector of late-phase-dependent activation of the major late promoter. *J Virol* **70**: 1396-405.
- Lutz P, Rosa-Calatrava M, Kedinger C (1997). The product of the adenovirus intermediate gene IX is a transcriptional activator. *J Virol* **71**: 5102-9.
- Machida K, Cheng KT, Sung VM, Shimodaira S, Lindsay KL, Levine AM, Lai MY, Lai MM (2004). Hepatitis C virus induces a mutator phenotype: enhanced mutations of immunoglobulin and protooncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 4262-7.
- Macintosh CA, Stower M, Reid N, Maitland NJ (1998). Precise microdissection of human prostate cancers reveals genotypic heterogeneity. *Cancer Res* **58**: 23-8.
- Mackey JK, Green M, Wold WS, Rigden P (1979). Analysis of human cancer DNA for DNA sequences of human adenovirus type 4. *J Natl Cancer Inst* **62**: 23-6.
- Mackey JK, Rigden PM, 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**: 4657-61.
- Maheswaran S, Englert C, Lee SB, Ezzel RM, Settleman J, Haber DA (1998). E1B 55K sequesters WT1 along with p53 within a cytoplasmic body in adenovirus-transformed kidney cells. *Oncogene* **16**: 2041-50.
- Mahr JA, Boss JM, Gooding LR (2003). The adenovirus e3 promoter is sensitive to activation signals in human T cells. *J Virol* **77**: 1112-9.
- Martin ME, Berk AJ (1998). Adenovirus E1B 55K represses p53 activation in vitro. *J Virol* **72**: 3146-54.
- Martin ME, Berk AJ (1999). Corepressor required for adenovirus E1B 55,000-molecular-weight protein repression of basal transcription. *Mol Cell Biol* **19**: 3403-14.
- Marton MJ, Baim SB, Ornelles DA, Shenk T (1990). The adenovirus E4 17-kilodalton protein complexes with the cellular transcription factor E2F, altering its DNA-binding properties and stimulating E1A-independent accumulation of E2 mRNA. *J Virol* **64**: 2345-59.
- Massimi P, Shai A, Lambert P, Banks L (2008). HPV E6 degradation of p53 and PDZ containing substrates in an E6AP null background. *Oncogene* **27**: 1800-4.
- Mathews MB (1990). Control of translation in adenovirus-infected cells. *Enzyme* **44**: 250-64.
- Matlin AJ, Clark F, Smith CW (2005). Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 386-98.
- Mayo LD, Seo YR, Jackson MW, Smith ML, Rivera Guzman J, Korgaonkar CK, Donner DB (2005). Phosphorylation of human p53 at serine 46 determines promoter selection and whether apoptosis is attenuated or amplified. *J Biol Chem* **280**: 25953-9.
- McLorie W, McGlade CJ, Takayesu D, Branton PE (1991). Individual adenovirus E1B proteins induce transformation independently but by additive pathways. *J Gen Virol* **72** (Pt 6): 1467-71.
- McNees AL, Gooding LR (2002). Adenoviral inhibitors of apoptotic cell death. *Virus Res* **88**: 87-101.
- McNees AL, Mahr JA, Ornelles D, Gooding LR (2004). Postinternalization inhibition of adenovirus gene expression and infectious virus production in human T-cell lines. *J Virol* **78**: 6955-66.
- Meek DW (2002). p53 Induction: phosphorylation sites cooperate in regulating. *Cancer Biol Ther* **1**: 284-6.
- Mitsudomi T, Steinberg SM, Nau MM, Carbone D, D'Amico D, Bodner S, Oie HK, Linnoila RI, Mulshine JL, Minna JD, 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**: 171-80.

- Modrow S, Falke D (2002). *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH: Heidelberg.
- Mohammadi ES, Ketner EA, Johns DC, Ketner G (2004). Expression of the adenovirus E4 34k oncoprotein inhibits repair of double strand breaks in the cellular genome of a 293-based inducible cell line. *Nucleic Acids Res* **32**: 2652-9.
- Montell C, Fisher EF, Caruthers MH, Berk AJ (1984). Control of adenovirus E1B mRNA synthesis by a shift in the activities of RNA splice sites. *Mol Cell Biol* **4**: 966-72.
- Moore M, Horikoshi N, Shenk T (1996). Oncogenic potential of the adenovirus E4orf6 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 11295-301.
- Morgan WF, Day JP, Kaplan MI, McGhee EM, Limoli CL (1996). Genomic instability induced by ionizing radiation. *Radiat Res* **146**: 247-58.
- Munger K, Howley PM (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* **89**: 213-28.
- Nasz I, Kulcsar G, Dan P, Sallay K (1971). A possible pathogenic role for virus-carrier lymphocytes. *J Infect Dis* **124**: 214-6.
- Nevels M, Rubenwolf S, Spruss T, Wolf H, 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 U S A* **94**: 1206-11.
- Nevels M, Spruss T, Wolf H, 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.
- Nevels M, Täuber B, Spruss T, Wolf H, Dobner T (2001). "Hit-and-run" transformation by adenovirus oncogenes. *J Virol* **75**: 3089-94.
- Nevins JR (1992). E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* **258**: 424-9.
- Nevins JR, Leone G, DeGregori J, Jakoi L (1997). Role of the Rb/E2F pathway in cell growth control. *J Cell Physiol* **173**: 233-6.
- Nevins JR, Vogt PK (2007). *Cell Transformation by Viruses*, 5 edn. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business: New York.
- Norbury CJ, Zhivotovsky B (2004). DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* **23**: 2797-808.
- O'Shea CC, Johnson L, Bagus B, Choi S, Nicholas C, Shen A, Boyle L, Pandey K, Soria C, Kunich J, Shen Y, Habets G, Ginzinger D, McCormick F (2004). Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity. *Cancer Cell* **6**: 611-23.
- Ohiro Y, Usheva A, Kobayashi S, Duffy SL, Nantz R, Gius D, Horikoshi N (2003). Inhibition of stress-inducible kinase pathways by tumorigenic mutant p53. *Mol Cell Biol* **23**: 322-34.
- Okamoto K, Beach D (1994). Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. *Embo J* **13**: 4816-22.
- Orlando JS, Ornelles DA (2002). E4orf6 variants with separate abilities to augment adenovirus replication and direct nuclear localization of the E1B 55-kilodalton protein. *J Virol* **76**: 1475-87.
- Ornelles DA, Shenk T (1991). Localization of the adenovirus early region 1B 55-kilodalton protein during lytic infection: association with nuclear viral inclusions requires the early region 4 34-kilodalton protein. *J Virol* **65**: 424-9.
- Palmiter RD, Sandgren EP, Avarbock MR, Allen DD, Brinster RL (1991). Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 478-82.
- Paraskeva C, Brown KW, Dunn AR, Gallimore PH (1982). Adenovirus type 12-transformed rat embryo brain and rat liver epithelial cell lines: adenovirus type 12 genome content and viral protein expression. *J Virol* **44**: 759-64.
- Paraskeva C, Gallimore PH (1980). Tumorigenicity and in vitro characteristics of rat liver epithelial cells and their adenovirus-transformed derivatives. *Int J Cancer* **25**: 631-9.

- Paull TT, Gellert M (1998). The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* **1**: 969-79.
- Perricaudet M, Akusjarvi G, Virtanen A, Pettersson U (1979). Structure of two spliced mRNAs from the transforming region of human subgroup C adenoviruses. *Nature* **281**: 694-6.
- Petrini JH, Stracker TH (2003). The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol* **13**: 458-62.
- Pfeffer A, Schubbert R, Orend G, Hilger-Eversheim K, Doerfler W (1999). Integrated viral genomes can be lost from adenovirus type 12-induced hamster tumor cells in a clone-specific, multistep process with retention of the oncogenic phenotype. *Virus Res* **59**: 113-27.
- Pilder S, Moore M, Logan J, Shenk T (1986). The adenovirus E1B-55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs. *Mol Cell Biol* **6**: 470-6.
- Purkayastha A, Su J, McGraw J, Ditty SE, Hadfield TL, Seto J, Russell KL, Tibbetts C, Seto D (2005). Genomic and bioinformatics analyses of HAdV-4vac and HAdV-7vac, two human adenovirus (HAdV) strains that constituted original prophylaxis against HAdV-related acute respiratory disease, a reemerging epidemic disease. *J Clin Microbiol* **43**: 3083-94.
- Querido E, Morrison MR, Chu-Pham-Dang H, Thirlwell SW, Boivin D, Branton PE (2001). Identification of three functions of the adenovirus e4orf6 protein that mediate p53 degradation by the E4orf6-E1B55K complex. *J Virol* **75**: 699-709.
- Reich NC, Sarnow P, Duprey E, Levine AJ (1983). Monoclonal antibodies which recognize native and denatured forms of the adenovirus DNA-binding protein. *Virology* **128**: 480-4.
- Resnick MA, Tomso D, Inga A, Menendez D, Bell D (2005). Functional diversity in the gene network controlled by the master regulator p53 in humans. *Cell Cycle* **4**: 1026-9.
- Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* **84**: 570-3.
- Ruben M, Bacchetti S, Graham FL (1982). Integration and expression of viral DNA in cells transformed by host range mutants of adenovirus type 5. *J Virol* **41**: 674-85.
- Rubewolf S, Schütt H, Nevels M, Wolf H, Dobner T (1997). Structural analysis of the adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton-E4orf6 protein complex. *J Virol* **71**: 1115-23.
- Russell WC (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* **81**: 2573-604.
- Sabbatini P, Chiou SK, Rao L, White E (1995). Modulation of p53-mediated transcriptional repression and apoptosis by the adenovirus E1B 19K protein. *Mol Cell Biol* **15**: 1060-70.
- Sadowski I, Ptashne M (1989). A vector for expressing GAL4(1-147) fusions in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **17**: 7539.
- Salomoni P, Khelifi AF (2006). Daxx: death or survival protein? *Trends Cell Biol* **16**: 97-104.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor.
- Sarnow P, Hearing P, Anderson CW, Halbert DN, Shenk T, Levine AJ (1984). Adenovirus early region 1B 58,000-dalton tumor antigen is physically associated with an early region 4 25,000-dalton protein in productively infected cells. *J Virol* **49**: 692-700.
- Sarnow P, Sullivan CA, Levine AJ (1982). A monoclonal antibody detecting the adenovirus type 5-E1b-58Kd tumor antigen: characterization of the E1b-58Kd tumor antigen in adenovirus-infected and -transformed cells. *Virology* **120**: 510-7.
- Scheffner M, Munger K, Byrne JC, Howley PM (1991). The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 5523-7.
- Sharma RC, Schimke RT (1996). Preparation of electrocompetent E. coli using salt-free growth medium. *Biotechniques* **20**: 42-4.

- Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham FL (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *Faseb J* **16**: 869-71.
- Shen Y, Kitzes G, Nye JA, Fattaey A, Hermiston T (2001). Analyses of single-amino-acid substitution mutants of adenovirus type 5 E1B-55K protein. *J Virol* **75**: 4297-307.
- Shen Y, Zhu H, Shenk T (1997). Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate "hit-and-run" oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 3341-5.
- Shibata R, Shinagawa M, Iida Y, Tsukiyama T (1989). Nucleotide sequence of E1 region of canine adenovirus type 2. *Virology* **172**: 460-7.
- Shiloh Y (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* **3**: 155-68.
- Si H, Robertson ES (2006). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded latency-associated nuclear antigen induces chromosomal instability through inhibition of p53 function. *J Virol* **80**: 697-709.
- Sieber T, Dobner T (2007). Adenovirus type 5 early region 1B 156R protein promotes cell transformation independently of repression of p53-stimulated transcription. *J Virol* **81**: 95-105.
- Skinner GR (1976). Transformation of primary hamster embryo fibroblasts by type 2 simplex virus: evidence for a "hit and run" mechanism. *Br J Exp Pathol* **57**: 361-76.
- Sourvinos G, Tsatsanis C, Spandidos DA (2000). Mechanisms of retrovirus-induced oncogenesis. *Folia Biol (Praha)* **46**: 226-32.
- Spector DJ, McGrogan M, Raskas HJ (1978). Regulation of the appearance of cytoplasmic RNAs from region 1 of the adenovirus 2 genome. *J Mol Biol* **126**: 395-414.
- Steegenga WT, Shvarts A, Riteco N, Bos JL, Jochemsen AG (1999). Distinct regulation of p53 and p73 activity by adenovirus E1A, E1B, and E4orf6 proteins. *Mol Cell Biol* **19**: 3885-94.
- Stewart PL, Fuller SD, Burnett RM (1993). Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *Embo J* **12**: 2589-99.
- Stone D, Furthmann A, Sandig V, Lieber A (2003). The complete nucleotide sequence, genome organization, and origin of human adenovirus type 11. *Virology* **309**: 152-65.
- Stracker TH, Carson CT, Weitzman MD (2002). Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11-Rad50-NBS1 DNA repair complex. *Nature* **418**: 348-52.
- Sugisaki H, Sugimoto K, Takanami M, Shiroki K, Saito I, Shimojo H, Sawada Y, Uemizu Y, Uesugi S, Fujinaga K (1980). Structure and gene organization in the transformed Hind III-G fragment of Ad12. *Cell* **20**: 777-86.
- Takayasu D, Teodoro JG, Whalen SG, Branton PE (1994). Characterization of the 55K adenovirus type 5 E1B product and related proteins. *J Gen Virol* **75 (Pt 4)**: 789-98.
- Tang J, Qu LK, Zhang J, Wang W, Michaelson JS, Degenhardt YY, El-Deiry WS, Yang X (2006). Critical role for Daxx in regulating Mdm2. *Nat Cell Biol* **8**: 855-62.
- Täuber B, Dobner T (2001). Adenovirus early E4 genes in viral oncogenesis. *Oncogene* **20**: 7847-54.
- Tavalai N, Papior P, Rechter S, Stamminger T (2008). Nuclear domain 10 components promyelocytic leukemia protein and hDaxx independently contribute to an intrinsic antiviral defense against human cytomegalovirus infection. *J Virol* **82**: 126-37.
- Teodoro JG, Branton PE (1997). Regulation of p53-dependent apoptosis, transcriptional repression, and cell transformation by phosphorylation of the 55-kilodalton E1B protein of human adenovirus type 5. *J Virol* **71**: 3620-7.
- Teodoro JG, Halliday T, Whalen SG, Takayasu D, Graham FL, Branton PE (1994). Phosphorylation at the carboxy terminus of the 55-kilodalton adenovirus type 5 E1B protein regulates transforming activity. *J Virol* **68**: 776-86.

- Teodoro JG, Shore GC, Branton PE (1995). Adenovirus E1A proteins induce apoptosis by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene* **11**: 467-74.
- Tognon M, Corallini A, Martini F, Negrini M, Barbanti-Brodano G (2003). Oncogenic transformation by BK virus and association with human tumors. *Oncogene* **22**: 5192-200.
- Tollefson AE, Ryerse JS, Scaria A, Hermiston TW, Wold WS (1996). The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. *Virology* **220**: 152-62.
- Tooze J (1981). *DNA tumor viruses*, 2 edn. Cold Spring Harbor: New York.
- Trentin JJ, Yabe Y, Taylor G (1962). The quest for human cancer viruses. *Science* **137**: 835-41.
- Trujillo KM, Yuan SS, Lee EY, Sung P (1998). Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *J Biol Chem* **273**: 21447-50.
- Vales LD, Darnell JE, Jr. (1989). Promoter occlusion prevents transcription of adenovirus polypeptide IX mRNA until after DNA replication. *Genes Dev* **3**: 49-59.
- van den Elsen P, de Pater S, Houweling A, van der Veer J, van der Eb A (1982). The relationship between region E1a and E1b of human adenoviruses in cell transformation. *Gene* **18**: 175-85.
- van der Veen J, Lambriex M (1973). Relationship of adenovirus to lymphocytes in naturally infected human tonsils and adenoids. *Infect Immun* **7**: 604-9.
- van Ormondt H, Hesper B (1983). Comparison of the nucleotide sequences of early region E1b DNA of human adenovirus types 12, 7 and 5 (subgroups A, B and C). *Gene* **21**: 217-26.
- Vellinga J, Van der Heijdt S, Hoeben RC (2005). The adenovirus capsid: major progress in minor proteins. *J Gen Virol* **86**: 1581-8.
- Virtanen A, Pettersson U (1985). Organization of early region 1B of human adenovirus type 2: identification of four differentially spliced mRNAs. *J Virol* **54**: 383-91.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* **319**: 525-32.
- Weinberg DH, Ketner G (1986). Adenoviral early region 4 is required for efficient viral DNA replication and for late gene expression. *J Virol* **57**: 833-8.
- Wessagowit V, Nalla VK, Rogan PK, McGrath JA (2005). Normal and abnormal mechanisms of gene splicing and relevance to inherited skin diseases. *J Dermatol Sci* **40**: 73-84.
- White E (1993). Regulation of apoptosis by the transforming genes of the DNA tumor virus adenovirus. *Proc Soc Exp Biol Med* **204**: 30-9.
- White E (2001). Regulation of the cell cycle and apoptosis by the oncogenes of adenovirus. *Oncogene* **20**: 7836-46.
- Wilson MC, Darnell JE, Jr. (1981). Control of messenger RNA concentration by differential cytoplasmic half-life. Adenovirus messenger RNAs from transcription units 1A and 1B. *J Mol Biol* **148**: 231-51.
- Wilson MC, Fraser NW, Darnell JE, Jr. (1979). Mapping of RNA initiation sites by high doses of uv irradiation: evidence for three independent promoters within the left 11% of the Ad-2 genome. *Virology* **94**: 175-84.
- Windheim M, Hilgendorf A, Burgert HG (2004). Immune evasion by adenovirus E3 proteins: exploitation of intracellular trafficking pathways. *Curr Top Microbiol Immunol* **273**: 29-85.
- Wold WS, Mackey JK, Rigden P, 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**: 3479-84.
- Wold WSM, Horwitz MS (2007). *Adenoviridae: The viruses and their replication*, 5 edn. Raven Press: New York, N. Y.
- Woo JL, Berk AJ (2007). Adenovirus ubiquitin-protein ligase stimulates viral late mRNA nuclear export. *J Virol* **81**: 575-87.

- Yamasaki M, Takeshima Y, Fujii S, Matsuura M, Tagawa K, Inai K (2000). Correlation between morphological heterogeneity and genetic alteration within one tumor in adenocarcinomas of the lung. *Pathol Int* **50**: 891-6.
- Yang XJ (2005). Multisite protein modification and intramolecular signaling. *Oncogene* **24**: 1653-62.
- Yee KS, Vousden KH (2005). Complicating the complexity of p53. *Carcinogenesis* **26**: 1317-22.
- Yew PR, Berk AJ (1992). Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature* **357**: 82-5.
- Yew PR, Kao CC, Berk AJ (1990). Dissection of functional domains in the adenovirus 2 early 1B 55K polypeptide by suppressor-linker insertional mutagenesis. *Virology* **179**: 795-805.
- Yew PR, Liu X, Berk AJ (1994). Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. *Genes Dev* **8**: 190-202.
- Zantema A, Fransen JA, Davis-Olivier A, Ramaekers FC, Vooijs GP, DeLeys B, Van der Eb AJ (1985). Localization of the E1B proteins of adenovirus 5 in transformed cells, as revealed by interaction with monoclonal antibodies. *Virology* **142**: 44-58.
- Zeller T (2003). In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen funktioneller Bereiche des Adenovirus Typ 5 E1B-55kDa-Proteins. In: *Naturwissenschaftliche Fakultät III*. Universität Regensburg: Regensburg.
- Zhao LY, Colosimo AL, Liu Y, Wan Y, Liao D (2003). Adenovirus E1B 55-kilodalton oncoprotein binds to Daxx and eliminates enhancement of p53-dependent transcription by Daxx. *J Virol* **77**: 11809-21.
- Zheng BJ, Graham FL, Prevec L (1999). Transcription units of E1a, E1b and pIX regions of bovine adenovirus type 3. *J Gen Virol* **80 (Pt 7)**: 1735-42.

8 VERÖFFENTLICHUNGEN

I Posterpräsentation

Sieber, T., B. Härtl, J. Hauber & T. Dobner. 2004. Cytoplasmic sequestration of p53 in transformed rat cells is independent from CRM1-dependent nuclear export of the adenovirus type 5 E1B-55kDa protein. ICGEB DNA Tumour Virus Meeting 2004, Madison, USA

Sieber, T. & T. Dobner. 2005. p53-independent cell transformation by the adenovirus type 5 E1B-156R protein. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 2005, Hannover

Sieber, T. & T. Dobner. 2007. Adenovirus type 5 early region 1B 156R protein promotes cell transformation independent from repression of p53-stimulated transcription. Posterpräsentation am Heinrich-Pette-Institut 2007, Hamburg

Sieber, T., R. Scholz & T. Dobner. 2007. Function of the adenovirus E1B-55K oncoprotein is modulated by minor E1B products. European Congress of Virology 2007, Nürnberg

II Vorträge auf Fachtagungen

Sieber, T. & T. Dobner. 2005. p53-independent cell transformation by the adenovirus type 5 E1B-156R protein. ICGEB DNA Tumour Virus Meeting 2005, Cambridge, UK

III Artikel in Fachzeitschriften

Sieber, T. & T. Dobner. 2007. Ad5 E1B-156R promotes transformation independent from repression of p53 stimulated transcription. *J. Virol.* **81**: 95-105.

9 DANKSAGUNG

Bei Herrn Prof. Dr. Hans Wolf bedanke ich mich herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg.

Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer danke ich vielmals für die bereitwillige Betreuung dieser Arbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg und für die Erstellung des Erstgutachtens.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Dobner für seine engagierte Unterstützung sowie für das spannende Thema bedanken. Seine Betreuung ermöglichte es mir meinen eigenen Weg zu gehen, wobei ich aber auch jederzeit Rat, Hilfe und Anleitung bei ihm finden konnte. Auch danke ich ihm dafür, dass er immer ein offenes Ohr für Probleme, Thesen und Gedanken hatte.

Es heißt, „Nichts beflügelt die Wissenschaft so, wie der Schwatz mit Kollegen auf dem Flur.“ (Arno Penzias, amerik. Physiker). Weil dem wirklich so ist, möchte ich mich herzlich bei meinen jetzigen und ehemaligen Kollegen in der Arbeitsgruppe Dobner/Abteilung 1 für die guten wissenschaftlichen, nicht-wissenschaftlichen und gänzlich absurden Gespräche bedanken, die die oft langen Stunden im Labor wesentlich schöner gestalteten. Ich danke euch für die schöne Zeit sowie für das Korrekturlesen der Arbeit.

Insbesondere Barbara Härtl danke ich sehr für ihre unglaubliche Hilfsbereitschaft mit der sie mir und vielen Anderen so oft fachlich und anders weitergeholfen hat. Auch für das kompetente, ausdauernde und kritische Lesen meiner Arbeit möchte ich ihr Danken. Ihre Vorschläge haben wohl wesentlich zur Qualität der Arbeit beigetragen.

Peter Groitl danke ich für Rat und Hilfe bei Virusmutagenese und anderen problematischen DNA-Manipulationen. Außerdem honoriere ich seinen, leidenschaftlichen - wenn auch fruchtlosen - Versuch mich musikalisch zu läutern.

Tanja Lucas danke ich dafür, dass sie mich damals auf den Weg gebracht hat, für viel Spaß und ebenfalls für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Dr. Christina Paulus und Dr. Michael Nevels danke ich sehr dafür, dass sie mich nach dem Umzug der Arbeitsgruppe Dobner nach Hamburg so freundlich in ihrer Gruppe aufgenommen haben. Ich habe mich in der Zeit als assoziierter Wissenschaftler sehr wohl gefühlt.

Auch bei meinen Laborkollegen, die sich mit dem zweitschönsten Virus der Welt (CMV) beschäftigt haben, möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die schöne Zeit bedanken. Ohne euch hätte ich wohl nie erfahren was sich hinter „Dendaggelie“ verbirgt und auch meine musikalische Grundbildung wäre schlechter als sie heute ist. Danke auch für die vielen anregenden, naturwissenschaftlichen und philosophischen Gespräche über den großen Jup, die Welt, Fluorochrome und alles was den Forscher sonst noch interessiert.

Erwin und Gesine Hofmann danke ich sehr für ihre Unterstützung während der letzten Jahre. Meiner Großmutter, Maria Sieber danke ich für ihr jahrelanges Vertrauen und Daumendrücken – es hat mir sehr gut getan und Mut gemacht. Besonders meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen dafür, dass sie mich immer unterstützen, an mich glauben und mir ermöglicht haben mein Ziel zu erreichen ohne dabei die Welt ganz aus den Augen zu verlieren.

Wir sind diesen ganzen Weg zusammen gegangen, haben uns gemeinsam die Erlaubnis zur Promotion erkämpft und bringen sie jetzt gemeinsam zu Ende. Ich möchte dir für den Mut und die Kraft danken, die du mir in dieser Zeit gegeben hast. Danke Helga.