

**IDENTIFIZIERUNG REGULATORISCHER BEREICHE
IM E1B-55kDa PROTEIN VON ADENOVIRUS
SEROTYP 5 UND IHRE ROLLE BEI DER
TRANSFORMATION**



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

vorgelegt von
Christian Endter
aus Köfering

2002

Die vorliegende Arbeit wurde selbständig und ohne
unzulässige Hilfe angefertigt

Christian Endter

Promotionsgesuch eingereicht am: 08.04.2002

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.02

Die Arbeit wurde angeleitet von: PD Dr. Thomas Dobner und Prof. Dr. Eggehard Holler

Prüfungsausschuß:	Prof. Dr. B. Darnhofer-Demar (Vorsitzender)
	Prof. Dr. Eggehard Holler (1. Gutachter, 1. Prüfer)
	PD Dr. Thomas Dobner (2. Gutachter, 2. Prüfer)
	Prof. Dr. W. Moll (3. Prüfer)

Die Arbeit wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Eggehard Holler betreut

*It is only with the heart
that one can see rightly,
what is essential
is invisible to the eye.*

Antoine de Saint-Exupery

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
--------------------------------	----------

ABKÜRZUNGEN.....	IV
-------------------------	-----------

1 EINLEITUNG.....	1
--------------------------	----------

1.1 TRANSFORMATION DURCH TUMORVIREN.....	1
-------------------------------------------------	----------

1.1.1 Transformation und Tumorbildung	1
1.1.2 Onkogene Viren des Menschen.....	1

1.2 ADENOVIREN.....	3
----------------------------	----------

1.2.1 Onkogenes Potential der humanen Adenoviren.....	3
1.2.2 Genomorganisation und produktiver Replikationszyklus humaner Adenoviren	5
1.2.3 Die Rolle der E1-Proteine von Ad5 bei der Transformation	8
1.2.3.1 Die E1A-Proteine	8
1.2.3.2 E1B-19kDa.....	11
1.2.3.3 E1B-55kDa.....	12

1.3 POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATION DURCH SUMO-1.....	17
--------------------------------------------------------------	-----------

1.3.1 SUMO und SUMO-spezifische Enzyme	17
1.3.2 Zielproteine und mögliche Funktionen der SUMO-1-Modifikation.....	21
1.3.2.1 Zelluläre Substratproteine.....	21
1.3.2.2 Virale Substratproteine	24

1.4 AUFGABENSTELLUNG.....	26
----------------------------------	-----------

2 MATERIAL.....	27
------------------------	-----------

2.1 ZELLEN.....	27
------------------------	-----------

2.1.1 Säugerzelllinien	27
2.1.2 Bakterienstämme	28
2.1.3 Viren.....	28

2.2 NUKLEINSÄUREN.....	29
-------------------------------	-----------

2.2.1 Oligonukleotide	29
2.2.2 Plasmide	30

2.3 ENZYME, REAGENTIEN UND NACHWEISSYSTEME	31
---------------------------------------------------------	-----------

2.4 ANTIKÖRPER.....	32
----------------------------	-----------

2.4.1 Primärantikörper.....	32
2.4.2 Sekundärantikörper.....	33

2.5 HÄUFIG VERWENDETE PUFFER	34
-------------------------------------------	-----------

2.6 CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIAL	34
-----------------------------------------------------	-----------

2.7 GRÖßEN- UND MOLEKULARGEWICHTSMARKER.....	35
-----------------------------------------------------	-----------

2.8 COMPUTERPROGRAMME UND DATENBANKEN.....	35
---------------------------------------------------	-----------

3 METHODEN.....	37
------------------------	-----------

3.1 BAKTERIEN.....	37
---------------------------	-----------

3.1.1 Kulturbedingungen und Lagerung.....	37
3.1.1.1 Plattenkulturen.....	37

3.1.1.2 Flüssigkulturen.....	37
3.1.1.3 Glycerinkulturen	37
3.1.2 Transformation von <i>E. coli</i> nach der Rubidiumchlorid-Methode.....	38
3.1.3 Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation.....	40
3.2 GEWEBEKULTUR.....	41
3.2.1 Vermehrung und Aufbewahrung von Zellen.....	41
3.2.1.1 Kultivierung von Säugerzellen als Einschichtkultur	41
3.2.1.2 Gewinnung und Kultivierung primärer Rattennierenzellen	41
3.2.1.3 Lagerung von Säugerzellen.....	42
3.2.2 Bestimmung der Gesamt-Zellzahl	42
3.2.3 Transfektion von Säugerzellen	42
3.2.4 Etablierung von Zelllinien aus transformierten Rattenzellen	43
3.2.5 Infektion von Säugerzellen mit Adenoviren.....	44
3.2.6 Ernte und Aufschluß von Zellen.....	44
3.2.6.1 Ernte von Säugerzellen.....	44
3.2.6.2 Aufschluß von Säugerzellen	45
3.3 ADENOVIREN	45
3.3.1 Titerbestimmung von Virusstocks.....	45
3.3.2 Isolierung von Viren aus der Zellkultur.....	46
3.4 PROTEIN	46
3.4.1 Quantitative Proteinbestimmung im BIORAD Protein-Assay	46
3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
3.4.3 Western Blot.....	48
3.4.4 Immunpräzipitation	49
3.4.5 Immunfluoreszenz.....	51
3.4.6 Reporter-Assay	51
3.5 DNA.....	53
3.5.1 Synthese und Reinigung synthetischer Oligonukleotide	53
3.5.2 Präparation, Reinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA.....	54
3.5.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	54
3.5.2.2 Agarosegelelektrophorese	54
3.5.2.3 Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	55
3.5.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA	56
3.5.3 Restriktionsenzym-Spaltung von DNA	57
3.5.3.1 Analytische Spaltung zur Charakterisierung von Plasmiden	57
3.5.3.2 Präparative Spaltung für Klonierungen	57
3.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	57
3.5.4.1 Standard PCR-Ansatz.....	57
3.5.4.2 Einführen von Mutationen durch PCR.....	58
3.5.5 Ligation	58
3.5.6 Identifikation rekombinanter Klone	59
3.5.7 DNA-Sequenzierung	59
4 ERGEBNISSE.....	61
4.1 SUMO-1-MODIFIKATION VON Ad5 E1B-55kDa.....	61
4.1.1 Identifizierung einer SUMO-1-Konsensussequenz im E1B-55kDa-Protein von Ad5.....	61
4.1.2 Ad5 E1B-55kDa wird <i>in vivo</i> an Position 104 durch SUMO-1 modifiziert.....	61
4.1.3 SUMO-2- und SUMO-3-Modifikation von Ad5 E1B-55kDa	64
4.2 DIE ROLLE DER SUMO-1-MODIFIKATION BEI DER E1A/E1B-55kDa-VERMITTELTEN TRANSFORMATION.....	66
4.2.1 Verlust der transformierenden Eigenschaften von Ad5 E1B-55kDa durch Mutation der SUMO-1-Akzeptorsequenz.....	66
4.2.2 K104R-Mutation der SUMO-1-Akzeptorregion von Ad5 E1B-55kDa beeinflusst nicht die Interaktion mit p53	68
4.2.3 SUMO-1-Konjugation von Ad5 E1B-55kDa ist notwendig für die Inhibition der p53 Transaktivierung	69

4.3 EINFLUß DER SUMO-1-KONJUGATION AUF DIE SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON AD5 E1B-55kDa.....	72
4.3.1 Lokalisation von Ad5 E1B-55kDa und SUMO-1 in transformierten Rattenzellen	72
4.3.2 Einfluß der SUMO-1-Modifikation auf die Pendelaktivität von Ad5 E1B-55kDa	74
4.4 ROLLE DES NES VON AD5 E1B-55kDa UND DER SUMO-1-KONSENSUSSEQUENZ VON AD12 E1B-54kDa IN DER TRANSFORMATION.....	76
4.4.1 Aminoterminaler Sequenzvergleich von Ad5 E1B-55kDa und Ad12 E1B-54kDa.....	76
4.4.2 Verifizierung der Pendelaktivität von Ad5 E1B-55kDa in transfizierten Rattenzellen	77
4.4.3 Ad5 E1B-NES, nicht aber Ad12 E1B-54kDa, wird <i>in vivo</i> durch SUMO-1 modifiziert	80
4.4.4 Die Inhibition des nukleären Exports von E1B-55kDa verringert nicht sein kooperatives transformierendes Potential.....	82
4.4.5 Potentielle SUMO-1-Konsensusmotive von Ad12 E1B-54kDa spielen keine Rolle bei der E1A-gekoppelten Transformation	84
4.4.6 Interaktion von E1B-NES und E1B-K104R-NES mit p53.....	86
4.4.7 Nukleäre Retention von Ad5 E1B-55kDa verstärkt die Inhibition der p53 Transaktivierung.....	87
4.4.8 Potentielle SUMO-1-Konsensusmotive von Ad12 E1B-54kDa spielen keine Rolle bei Inhibition der p53-Transaktivierung.....	90
4.5 INTRANUKLEÄRE PROTEINKOMPLEXE ALS DURCHGANGSSTATIONEN WÄHREND DER PENDELAKTIVITÄT VON AD5 E1B-55kDa.....	91
4.5.1 Intranukleäre Akkumulation von E1B-55kDa und p53 bei Inhibition des nukleären Exports ...	91
4.5.2 PODs als transiente Aufenthaltsstationen während der Pendelaktivität von Ad5 E1B-55kDa	94
5 DISKUSSION.....	98
5.1 POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATION VON AD5 E1B-55kDa IN VIVO.....	98
5.2 DAS TRANSFORMIERENDE POTENTIAL DER GROßEN E1B-PROTEINE VON AD5 UND AD12.....	100
5.2.1 Ad5 E1B-55kDa	100
5.2.2 Ad12 E1B-54kDa	105
5.3 DIE SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON AD5 E1B-55kDa	107
5.3.1 Akkummulation von E1B-55kDa, p53 und SUMO-1 in subnukleären Strukturen	107
5.3.2 Bedeutung der POD-Lokalisation von Ad5 E1B-55kDa bei der Transformation	109
5.3.2.1 PODs–subnukleäre Proteinkomplexe.....	109
5.3.2.2 PODs als Ziele viraler Proteine.....	110
5.3.2.3 Potentielle Rolle von PML bei der Ad E1-vermittelten Transformation	113
5.4 MODELLVORSTELLUNG	115
5.5 AUSBLICK	117
6 ZUSAMMENFASSUNG.....	119
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	121
VERÖFFENTLICHUNGEN.....	137
DANKSAGUNG	138

ABKÜRZUNGEN

#	Datenbanknummer der Arbeitsgruppe
AS	Aminosäuren (<i>amino acids</i>)
Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
BPV	Bovines Papillomavirus
CMV	Cytomegalovirus
DMEM	Zellmedium (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GTP	Guanosintriphosphat
hnRNP	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein
H ₂ O _{bid}	Zweifach destilliertes Wasser aus einer MILLIPORE-Anlage
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HHV	Humanes Herpesvirus
HPV	Humanes Papillomvirus
HTLV-1	Humanes T-Zell-Leukämievirus Typ 1
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HSV	Herpes simplex Virus
hpi	Stunden nach Infektionsbeginn (<i>hours post infectionem</i>)
Ig	Immunglobuline
LCMV	Virus der lymphocytären Choriomeningitis
NK	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
orf	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
pfu	Plaque-bildende Einheit (<i>plaque forming unit</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TAg	Großes Tumor Antigen von SV40
Taq	DNA-abhängige DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
v/v	Volumenanteil pro Volumenanteil (<i>volume per volume</i>)
w/v	Gewichtsanteil pro Volumenanteil (<i>weight per volume</i>)
WT	Wildtyp

1 EINLEITUNG

1.1 TRANSFORMATION DURCH TUMORVIREN

1.1.1 TRANSFORMATION UND TUMORBILDUNG

Unter Transformation versteht man die Umwandlung „normaler“ Zellen (Elternzellen) durch Einwirken von Viren, karzinogenen Substanzen, energiereicher Strahlung, oder gelegentlich auch spontan, in Zellen, die sich in ihren Eigenschaften, vor allem aber in der Regulation des Zellwachstums von den Elternzellen unterscheiden und Tumorzellen ähneln. Transformierte Zellen weisen bestimmte, vom normalen Verhalten der Zelle abweichende Charakteristika auf. In der *in vitro* Kultur sind sie in der Regel durch eine Reihe von Veränderungen charakterisiert, die vor allem die Zell- und Koloniemorphologie, Proliferationseigenschaften sowie Membran- und immunologische Eigenschaften betreffen. Die Fähigkeit zur Tumorbildung (Tumorgenese) beruht auf einem mehrstufigen Prozeß der onkogenen Transformation, durch den normale, primäre Körperzellen schrittweise in Tumorzellen umgewandelt werden. Auf molekularer Ebene läßt sich die Transformation auf den Verlust der Wachstumskontrolle durch Aktivierung von Onkoproteinen und/oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorproteinen (Antionkogene) zurückführen (Alberts *et al.*, 1995). Translokationen, Deletionen, Amplifikationen u.a. Mutationen in der chromosomalen DNA spielen dabei ebenfalls eine entscheidende Rolle.

1.1.2 ONKOGENE VIREN DES MENSCHEN

Maligne Tumore stellen neben Kreislauferkrankungen die häufigste Todesursache des Menschen in den westlichen Industrienationen dar. Nach Angaben der WHO beruhen über 20% aller Todesfälle auf Krebserkrankungen, wovon etwa $\frac{1}{5}$ aller Tumorformen ätiologisch mit Virusinfektionen assoziiert werden. Tab. 1 zeigt alle bis heute bekannten humanen Viren mit onkogenem Potential (Modrow und Falke, 1997).

Onkogene Viren (Tumerviren) sind DNA- oder RNA-haltige Viren, die in geeigneten Versuchstieren und möglicherweise auch beim Menschen Tumore induzieren und z.T. *in vitro*

eine maligne Transformation von Zellen verursachen. Die virale Transformation ist auf die Wirkung eines oder mehrerer viraler Onkogene zurückzuführen, die bestimmte, zur Einleitung und Aufrechterhaltung der Transformation notwendige Proteine kodieren. Dabei sind für das Zustandekommen des transformierten Phänotyps wahrscheinlich eine enge Wechselwirkung viraler und zellulärer Funktionen sowie Veränderungen des zellulären Stoffwechsels notwendig.

Tab. 1: Kanzerogene Viren des Menschen

TAXONOMIE	VIRUS	ENTITÄT	VIRALE ONKOPROTEINE
<u>DNA-Viren</u>			
Hepadnaviridae	HBV	Primäres Leberzellkarzinom	HBx
Herpesviridae	EBV	Nasopharynxkarzinom Burkitt's Lymphom Hodgkin Lymphom	LMP-1 BZLF-1 LMP-1
	HHV8	Kaposi Sarkom	ORF72
Papovaviridae	HPV	Zervixkarzinom u. a. Karzinome	E6 und E7
<u>RNA-Viren</u>			
Retroviridae	HTLV-1	Adulte T-Zell- Leukämie	Tax
Flaviviridae	HCV	Primäres Leberzellkarzinom	unbekannt

Bei der malignen Transformation einer Zelle wird das Virusgenom in der Regel in das Zellgenom integriert. Im Falle der RNA-haltigen onkogenen Viren wird mittels der reversen Transkriptase sowie anderer Enzyme eine doppelsträngige DNA-Kopie des viralen Genoms synthetisiert, die als Provirus in das Wirtszellgenom integriert wird. Die malignisierende Wirkung der onkogenen RNA-Viren ist aber nicht an das gesamte Virusgenom, sondern nur an spezifische Abschnitte davon (Onkogene) gebunden. Die virale Integration in die Wirts-DNA kann aber auch zelluläre Gene direkt zerstören, oder es gelangen wenig transkribierte Gene unter den Einfluß viraler Promotoren. Eine erhöhte Expression der entsprechenden Proteine

kann die Stoffwechsel-/Zellzyklus-Regulation entscheidend beeinflussen, sodaß sowohl der Tod als auch die Transformation der Zelle in eine Tumorzelle denkbar sind.

Die meisten Viren, die mit Tumorerkrankungen beim Menschen assoziiert sind, haben ein DNA-Genom und besitzen bestimmte virale Regulatorproteine, die vor allem die Funktion der zellulären Tumorsuppressoren ausschalten und die Transformation der Wirtszelle einleiten.

1.2 ADENOVIREN

1.2.1 ONKOGENES POTENTIAL DER HUMANEN ADENOVIREN

Entscheidend für den Nachweis eines Kausalzusammenhanges einer Virusinfektion und einer Tumorentstehung ist der Beweis einer Persistenz viraler Gene in den transformierten Zellen. Adenoviren konnten bislang nie überzeugend mit malignen Erkrankungen des Menschen assoziiert werden. Es existieren zwar einige Hinweise auf eine adenovirale Beteiligung an Tumoren z.B. des Urogenitaltrakts durch den Nachweis einzelner Genomabschnitte in den Tumorzellen (Csata *et al.*, 1982; Csata *et al.*, 1982; Ibelgaufits *et al.*, 1982; Kuwano *et al.*, 1997; Kuwano *et al.*, 1997; Lawler *et al.*, 1994; Maitland *et al.*, 1981), aber es konnte bisher kein eindeutig gesicherter Beweis für einen Zusammenhang zwischen Infektion und Tumorentstehung hergestellt werden (Chauvin *et al.*, 1990; Green *et al.*, 1979; Mackey *et al.*, 1976; Mackey *et al.*, 1979). Erneute Untersuchungen verschiedenster Tumorgewebe mit den erst seit einigen Jahren zu Verfügung stehenden Methoden, wie z.B. der hochsensitiven PCR, könnten eventuell den Beweis für Adenoviren als potentielle humane Tumoviren erbringen. Seit einiger Zeit gibt es auch Hinweise, daß Adenoviren in die Tumorgenese eingreifen können, ohne daß die viralen Gene in den transformierten Zellen persistieren (Nevels *et al.*, 2001; Sanchez Prieto *et al.*, 1999; Skinner, 1976). Diese sogenannte *Hit&Run*-Hypothese macht es allerdings unmöglich, einen Kausalzusammenhang zwischen Infektion und Tumorgenese aufgrund persistierender viraler DNA in der Wirtszelle herzustellen.

Humane Adenoviren zählen aber trotzdem eindeutig zu den DNA-Tumoviren, da sie im heterologen, semipermissiven Tiersystem Tumore induzieren können. Trentin *et al.* zeigten 1962, daß Ad Serotyp 12 (Ad12) 30–50 Tage nach subkutaner Injektion in neugeborene Hamster (*Mesocricetus auratus*) die Bildung von undifferenzierten Sarkomen verursacht (Trentin *et al.*, 1962). Ähnliche Beobachtungen mit anderen Nagetieren und die Erkenntnis,

daß nicht alle adenoviralen Serotypen tumorigen sind, führten zu einer neuen Klassifizierung der über 50 verschiedenen humanen Serotypen in sechs Subgenera (A–F). Die Einteilung basiert hauptsächlich auf dem onkogenen Potential der Viren in Nagetieren, aber auch auf einigen weiteren Charakteristika, wie Hämagglutination, GC-Gehalt, Sequenzhomologien der viralen DNA u.a. (Graham, 1984; Modrow und Falke, 1997; Shenk, 1996). Virustypen der Subgruppe A (Ad12, 18, 31) sind hochonkogen, während die Vertreter der Subgruppe B (z.B. Ad 3, 7) schwach onkogen sind, und nur ineffizient und nach langer Inkubationszeit Tumore erzeugen. Viren der Subgruppe C–F werden heute als nicht-onkogen eingestuft. Eine bemerkenswerte Ausnahme bilden jedoch die Serotypen Ad9 und Ad10 der Subgruppe D, die Mammakarzinom-ähnliche Tumore in den Brustdrüsen weiblicher Ratten induzieren (Ankerst und Jonsson, 1989; Ankerst *et al.*, 1974; Glaunsinger *et al.*, 2001; Javier *et al.*, 1991; Jonsson und Ankerst, 1977; Thomas *et al.*, 2001). Interessanterweise sind aber alle humanen Adenoviren in der Lage, primäre Zellen in Gewebekultur zu immortalisieren oder zu transformieren (Nevins und Vogt, 1996). Während immortalisierte Zellen durch die adenovirale Infektion die Fähigkeit zu unendlicher Teilung erlangen, zeichnen sich die transformierten Zellen zusätzlich dadurch aus, daß sie bei Übertragung auf geeignete Tiere Tumore erzeugen. Abgesehen von dieser Eigenschaft haben beide Zellsysteme aber viele gemeinsame Charakteristika, die sie von normalen Zellen unterscheiden, wie z.B. deutliche morphologische Veränderungen, oder der Verlust der Kontaktinhibition und der Verankerungsabhängigkeit. Der Grad der Tumorigenität Ad-transformierter Zellen ist aber wiederum abhängig vom Virustyp und dem Immunsystem des Versuchstieres (Graham, 1984; Shenk, 1996; Williams *et al.*, 1995). Zellen, die mit Adenoviren des Subgenus A transformiert wurden, erzeugen in syngen, immunkompetenten Ratten ein Tumorwachstum, während Zellen, die mit Adenoviren des Subgenus C transformiert wurden, dasselbe tumorigene Potential nur in immunsupprimierten (Thymus-defizienten) Nagetieren aufweisen (Cook *et al.*, 1979; Cook und Lewis, 1979). Untersuchungen der Immunreaktion immunkompetenter Versuchstiere auf beide Zellsysteme zeigten, daß nur die hochonkogenen adenoviralen Vertreter in der Lage sind, die Expression und die Oberflächenpräsentation der MHC-Klasse I-Proteine zu inhibieren und somit in der Lage sind, der T-Zell- oder NK-Reaktion zu entgehen. Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen den frühen Onkoproteinen Ad12 E1A und Ad2/5 E1A (s. Abb. 1) scheinen hierbei eine große Rolle zu spielen (Walker *et al.*, 1991; Bernards *et al.*, 1983; Schrier *et al.*, 1983; Nielsch *et al.*, 1991; Meijer *et al.*, 1992; Cook *et al.*, 1987; Cook *et al.*, 1986; Sawada *et al.*, 1985; Sheil *et al.*, 1984). Zudem enthalten die frühen Proteine der nichtonkogenen Adenoviren, wie z.B. Ad5, Epitope, die von den MHC-Klasse I-

Proteinen präsentiert und durch zytotoxische T-Zellen in immunkompetenten Tieren eliminiert werden können (Bellgrau *et al.*, 1988; Routes *et al.*, 1991). Entsprechende Epitope wurden in den äquivalenten Proteinen von Ad12 nicht gefunden.

Ein weiterer möglicher Grund für die hohe Onkogenität des Subgenus A in Nagetieren ist die unspezifische, nicht-homologe, aber stabile Integration der gesamten viralen DNA in das Wirtszellgenom (Graham, 1984; Ibelgaufts *et al.*, 1980; Tooze, 1981). Neben dem direkten mutagenen Effekt (Insertionsmutagenese) hat die Integration des Ad12-Genoms auch epigenetische Auswirkungen auf das DNA-Methylierungsmuster der Wirtszelle und somit auch auf die Transkription zellulärer Gene am Integrationsort oder solcher, die weiter entfernt liegen (*trans*-Effekt). Auch Sequenzamplifikationen und -umlagerungen werden durch die Insertion verursacht und können die Expression zellulärer Protoonkogene (c-my, c-jun) verändern (zur Übersicht: Doerfler, 1996; Doerfler *et al.*, 2001).

In Ad2/5-transformierten Zellen hingegen konnte man selten das vollständige virale Genom nachweisen, sondern meistens nur ein Fragment vom linken Ende des viralen Chromosoms, das die E1-Region enthält (s. Abb. 1; Flint *et al.*, 1976; Gallimore, 1974; Johansson *et al.*, 1978; Johansson *et al.*, 1977; Sharp *et al.*, 1974). Der Nachweis der durch die E1-Region kodierten Onkoproteine in allen Ad- und Plasmid-transformierten Zellen deutete darauf hin, daß die Integration der E1-Region in das Wirtszellgenom eine Voraussetzung für die Initiation der Transformation der Zellen ist. Allerdings scheint in einigen Ausnahmefällen die Anwesenheit der viralen Onkogene nicht notwendig zu sein für die Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps, was wiederum auf einen *Hit&Run*-Mechanismus hindeutet (Kuhlmann *et al.*, 1982; Paraskeva *et al.*, 1982; Paraskeva und Gallimore, 1980; Pfeffer *et al.*, 1999).

1.2.2 GENOMORGANISATION UND PRODUKTIVER REPLIKATIONSZYKLUS HUMANER

ADENOVIREN

Humane Adenoviren besitzen ein doppelsträngiges, lineares Genom mit einer Länge von 34–44 kb und enthalten neun Transkriptionseinheiten, die für etwa 40 verschiedene Proteine und zwei RNAs kodieren. Das Genom von Ad5 in Abb. 1 steht stellvertretend für alle humanen Adenoviren, die erwiesenermaßen eine ähnliche Genomstruktur haben und nahezu den gleichen Satz an Genprodukten exprimieren (Shenk, 1996).

Humane Adenoviren infizieren *in vivo* ein großes Spektrum unterschiedlicher Zellen wie z.B. Epithelzellen des Hals-, Nasen- und Rachenraums, der Lunge und des Verdauungstraktes. Zielzellen sind postmitotisch ruhende, terminal differenzierte Zellen der Schleimhäute, Adenoviren können aber problemlos *in vitro* in menschlichen Tumorzelllinien und primären Zellen vermehrt werden (Shenk, 1996). Die Infektion nicht-permissiver tierischer Zellen führt meist zu einem abortiven (nicht-lytischen) Infektionsverlauf. Unkontrollierte Zellproliferation und die Entstehung von Mutationen als primäre Schritte der Entartung der Zelle können davon die Folge sein. Dies deutet darauf hin, daß das Transformationspotential humaner Adenoviren von der Permissivität der Zellen abzuhängen scheint.

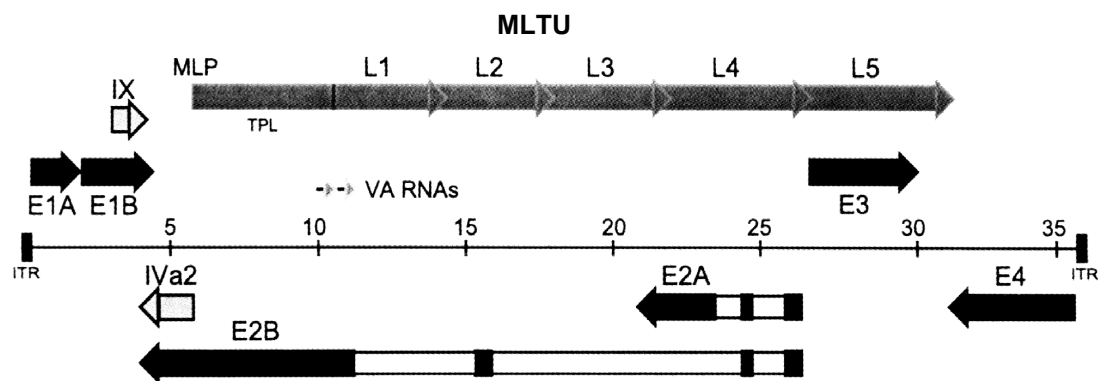


Abb. 1: Genomische Organisation von Ad Serotyp 5.

Dargestellt sind die frühen Gene (E1A, E1B, E2A/B, E3, E4, IX und IVa2) und die späte Transkriptionseinheit (MLTU), wobei die Pfeilrichtung die Transkriptionsrichtung auf den beiden kodierenden DNA-Strängen des viralen Genoms angibt. MLTU: *Major Late Transcription Unit*. MLP: *Major Late Promotor*. TPL: *Tripartite Leader*. VA RNAs: *Virus-associated RNAs*. ITR: *Inverted Terminal Repeat*.

Im produktiven Replikationszyklus erfolgt nach Adsorption, Endozytose und Kernimport des viralen DNA-Protein Komplexes die Transkription der viralen Gene und die Neusynthese der DNA (Bergelson *et al.*, 1997; Greber *et al.*, 1993; Nemerow, 2000; Shenk, 1996). Dieser Prozeß kann grob in vier Schritte eingeteilt werden:

- Synthese der frühen Proteine
- DNA-Replikation
- Synthese der späten Proteine
- Morphogenese

In der frühen Phase werden in einer zeitlich koordinierten Reihenfolge sämtliche frühen Transkriptionseinheiten E1–E4 durch die zelluläre RNA-Polymerase II gebildet. Ziel der

entsprechenden Genprodukte ist die Schaffung optimaler Bedingungen für die Virusreplikation in der Zelle. Vor allem der Eintritt der G_0 -Zellen in die S-Phase und die Zellzyklusprogression durch die E1A-Proteine ist für die virale Replikation essentiell, da nur in sich teilenden Zellen den Viren ein genügend großes Repertoire an Molekül-Bausteinen wie z.B. Desoxyribonukleinsäuren zur Verfügung steht (s. 1.2.3.1). Gleichzeitig werden durch frühe Proteine, die in der E1B (s. 1.2.3.2 und 1.2.3.3) und E3-Region kodiert sind, antivirale Schutzmechanismen wie Apoptose und Immunantwort unterdrückt. Die frühen viralen Genprodukte der E2-Region sind für die DNA-Replikation essentiell (Shenk, 1996), während die Bedeutung der mindestens sechs Polypeptide (E4orf1, E4orf2, E4orf3, E4orf4, E4orf6 und E4orf6/7), die durch alternatives Spleißen einer Vorläufer-RNA aus der E4-Region gebildet werden, noch teilweise unklar ist (zur Übersicht: Täuber und Dobner, 2001; Täuber und Dobner, 2001). Eine herausragende Rolle sowohl in der viralen Replikation als auch in der Transformation wird derzeit für E4orf3 und E4orf6 diskutiert. Trotz teilweise redundanter Funktionen konnte für beide Proteine eine Beteiligung beim alternativen Spleißen später viraler Transkripte (Nordqvist *et al.*, 1994; Ohman *et al.*, 1993), oder für E4orf6 eine Beteiligung am nukleozytoplasmatischen mRNA-Export in infizierten Zellen nachgewiesen werden (s. 1.2.3.3; Babiss *et al.*, 1985; Imperiale *et al.*, 1995; Pilder *et al.*, 1986). Außerdem scheint E4orf3 bei der Reorganisation subnukleärer Proteinkomplexe, dessen Komponenten wichtig sind für die virale Replikation, involviert zu sein (Carvalho *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996). Zudem besitzen beide Proteine transformierendes Potential und greifen sehr wahrscheinlich auch in den Prozeß der virusvermittelten Onkogenese ein (Dobner *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997; Nevels *et al.*, 2000; Nevels *et al.*, 1999; Nevels *et al.*, 1999).

Nach dem Einsetzen der viralen DNA-Replikation beginnt die späte Phase des lytischen Infektionszyklus und somit die Aktivierung der späten Transkriptionseinheit (MLTU, *major late transcription unit*). Durch differentiell Spleißen entstehen schließlich fünf Gruppen (L1–L5) verschieden langer mRNAs, die hauptsächlich für Strukturproteine des ikosaedrischen Kapsids kodieren. Alle 18 gebildeten mRNAs besitzen einen gemeinsamen 5'-nichtkodierenden Bereich, der als *Tripartite Leader* bezeichnet wird. Wesentlicher Bestandteil der späten Phase ist das Abschalten der zellulären Proteinsynthese (*host shutoff*) durch die Inaktivierung des *Cap-Binding* Komplexes eIF-4F. Dies führt dazu, daß nur noch *Cap*-unabhängige Translation, zu der idealerweise nur virale mRNAs mit der *Tripartite Leader*-Region fähig sind, stattfindet (Dolph *et al.*, 1988). Desweiteren begünstigt auch die Inhibition des zellulären mRNA-Exports und der präferentielle Transport viraler mRNAs ins Zytoplasma die Translation viraler Proteine (s. 1.2.3.3).

Nach der Biosynthese sämtlicher viraler Bausteine für die Bildung von Nachkommenviren, werden mit Hilfe von zellulären und viralen Chaperonen die Kapsomere im Zytoplasma zusammengesetzt, die letzten Schritte der Virus-Morphogenese ereignen sich anschließend im Zellkern. In Gewebekultur endet der produktive Replikationszyklus nach etwa 24 h mit dem Absterben der Wirtszelle, wobei je nach Serotyp bis zu 10.000 Viruspartikel produziert werden (Modrow und Falke, 1997; Shenk, 1996).

1.2.3 DIE ROLLE DER E1-PROTEINE VON AD5 BEI DER TRANSFORMATION

Aufgrund der Tatsache, daß man in fast allen Ad- und Plasmid-transformierten Zellen E1A- und E1B-Proteine nachweisen kann, hat man das onkogene Potential von Adenoviren hauptsächlich der frühen Region 1 (E1) zugeordnet. Sie enthält zwei aktive Transkriptionseinheiten: Eine kodiert für die E1A-, die zweite für die E1B-Proteine. Beide Proteingruppen gemeinsam sind für die *in vitro* Transformation von Nagetierzellen in Kultur notwendig und ausreichend. Die E1A-Proteine allerdings genügen, um die Zellen partiell zu transformieren. Die Zellen sind zwar immortalisiert, wachsen aber sehr langsam, zeigen häufig charakteristische Merkmale der Apoptose und sind nicht in der Lage, im Tierversuch Tumore zu induzieren. Erst durch die zusätzliche Anwesenheit der E1B-Proteine werden die Zellen vollständig transformiert und entwickeln je nach Serotyp ihr vollständiges tumorigenes Potential in syngenem immunkompetenten oder immundefizienten Nagetieren. Aufgrund von Beobachtungen (s. 1.2.3.1) weiß man heute, daß die E1A-Proteine für die Einleitung der Transformation notwendig sind. Die Funktion der E1B-Proteine ist die Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps (s. 1.2.3.2 und 1.2.3.3).

1.2.3.1 Die E1A-Proteine

Die Hauptprodukte der E1A-Gene der verschiedenen Subgenera werden durch alternatives Spleißen gebildet und werden bei Ad2/5 aufgrund ihrer mRNAs als 12S- und 13S-Form bezeichnet. Eine sehr ähnliche genomische Struktur findet man auch bei den anderen Serotypen. Das größere Polypeptid (13S) mit 289 AS unterscheidet sich von dem etwas kleineren (243 AS) durch eine zusätzliche konservierte Domäne (CR3), doch beide Genprodukte fungieren als Transaktivatoren der Transkription sowohl früher viraler Gene der

E2-, E3- und E4-Region als auch zahlreicher zellulärer Gene (Braithwaite und Russell, 2001; Shenk, 1996). Diese Funktion wird aber nicht durch direkte DNA-Bindung, sondern durch Wechselwirkung mit diversen zellulären Faktoren, wie z.B. dem Transkriptionsfaktor ATF-2, Koaktivator CBP/p300, Korepressor CtBP oder Komponenten der Transkriptionsinitiations-Komplexe wie TBP oder TAFs, vermittelt (Gallimore und Turnell, 2001; Mymryk, 1996). Mittlerweile sind bereits über 35 verschiedene zelluläre Proteine bekannt, deren Funktionen durch die Interaktion mit den E1A-Proteinen beeinflusst werden. Ziel des frühen Proteins ist die Zellzyklusprogression und die damit verbundene Initiation der zellulären DNA-Synthese. Durch die Bindung wichtiger regulatorischer Proteine z.B. der Retinoblastom- und p300-Familie oder anderer Faktoren, die eine zentrale Rolle in der Zellzyklusregulation und Transkriptionskontrolle einnehmen, kommt es zum unfahrplanmäßigen Eintritt der Wirtszelle in die S-Phase (Nevins, 1995; Russel, 2000; Shepherd *et al.*, 1993; White, 1998). Ein wichtiger Mechanismus ist z.B. die Interaktion von E1A mit dem Retinoblastom-Tumorsuppressorprotein (pRB), dessen eigentliche Funktion die Regulation des Eintritts der Zellen in die S-Phase ist (Morris und Dyson, 2001). Hauptsächlich durch die Wechselwirkung mit Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie wirkt es proliferationshemmend, da es in dieser Form die E2F-abhängige Transkription verhindert. Hyperphosphorylierung von pRB in der späten G1-Phase hebt die Bindung beider zellulärer Proteine auf und induziert dadurch die E2F-abhängige Transkription S-Phasen-spezifischer Gene, wie z.B. der Polymerase α , verschiedener Cykline sowie von Histongenen (Black und Azizkhan-Clifford, 1999; Muller und Helin, 2000; Nevins, 2001; Oswald *et al.*, 1996; Pearson *et al.*, 1991; Schulze *et al.*, 1995). Die E1A-Proteine sorgen in der frühen Phase der Infektion für eine dauerhafte Aktivität von E2F durch die Auflösung des pRb/E2F-Komplexes (Breckenridge und Shore, 2000; Gallimore und Turnell, 2001; Mayol und Grana, 1997; Mulligan und Jacks, 1998; Mymryk, 1996; Nevins, 1995; Paggi *et al.*, 1996; Whyte, 1995; Williams *et al.*, 1995). Auch andere virale Proteine, wie z.B. die E7-Proteine von HPV16 und HPV18, LMP1 von EBV oder das TAG-Protein von SV40 wirken in analoger Weise auf pRb/E2F-Komplexe ein (Chellappan *et al.*, 1992; Fries *et al.*, 1996; Jansen-Durr, 1996; Jansen-Durr, 1996; Moore und Chang, 1998; Vousden, 1995). Ein Nebeneffekt der Zellzyklusderegulierung ist aber die Induktion antiviraler Schutzmechanismen wie z.B. der Apoptose. E2F1 beispielsweise transaktiviert unter anderem auch p14^{ARF} (homologes Protein in der Maus: p19^{ARF}), ein alternatives Spleißprodukt eines negativen Regulators von pRB, des p16^{INK4A}-Proteins (Bates *et al.*, 1998; Chin *et al.*, 1998). p14^{ARF} interagiert wiederum mit Mdm2, dessen eigentliche Funktion als Ubiquitin-E3-Ligase die Kontrolle der transkriptionellen Aktivität des Tumorsuppressorproteins p53 ist (Pomerantz

et al., 1998; Weber *et al.*, 1999). Verminderter proteolytischer Abbau durch Störung der Interaktion beider Proteine führt zu erhöhten p53-Mengen in der Zelle (Haupt *et al.*, 1997; Kubbutat *et al.*, 1997). Das p53 Tumorsuppressorprotein nimmt als „Wächter des Genoms“ eine zentrale Stellung bei der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität durch die Kontrolle von Schlüsselereignissen im Zellzyklus wie z.B. DNA-Reparatur, Wachstum, Differenzierung, Zellzyklusarretierung, Apoptose und Seneszenz ein (Burns und El-Deiry, 1999; Giaccia und Kastan, 1998; Levine, 1997; Oren, 1999; Woods und Vousden, 2001). Es verhindert die Weitergabe von DNA-Schäden an die Tochterzellen und somit die Transformation der Zelle. Die Halbwertszeit des Proteins kann als Reaktion auf DNA-Schäden, hervorgerufen durch ionisierende Strahlen, UV-Strahlung, Sauerstoffmangel oder Nukleotidmangel, innerhalb kurzer Zeit hauptsächlich durch posttranslationale Modifikation am Carboxyterminus (z.B. Phosphorylierung oder Acetylierung), durch veränderte subzelluläre Lokalisation und/oder durch Inhibition des proteolytischen Abbaus erhöht werden. Als Folge davon entfaltet p53 sein transkriptionsaktivierendes Potential, das durch sequenzspezifische DNA-Bindung als Tetramer die Expression zahlreicher Gene, wie z.B. p21^{CIP/WAF}, GADD45, Mdm2, Bax1 u.a. aktivieren kann. Die Genprodukte sind hauptsächlich an der Zellzyklusregulation, der DNA-Reparatur und an der Initiation der Apoptose beteiligt. Aktiviertes p53 verhindert den Übergang von der G1- in die S-Phase hauptsächlich durch die Transaktivierung von p21^{CIP/WAF}, das in normalen Zellen in einem quartären Komplex mit Cyklin D, CDK4/6 (Cyklin-abhängige Kinase) und PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) vorliegt, aber in hohen Konzentrationen die Funktion der Cyklin-abhängigen Kinasen, nämlich die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (pRB, s.o.), inhibiert. Hypophosphorliertes pRB wiederum verhindert die Freisetzung von E2F und damit den G1/S-Phasenübergang. Außerdem inaktiviert p21^{CIP/WAF} durch Komplexierung mit PCNA auch dessen Replikationsfunktion. Irreparable DNA-Schäden hingegen führen unausweichlich zur p53-induzierten Apoptose. Die Transaktivierung des proapoptotischen Proteins Bax spielt dabei eine große Rolle (zur Übersicht: Haupt und Oren, 1996; Levine, 1997; Oren, 1999; Prives und Hall, 1999; Woods und Vousden, 2001; Zhan *et al.*, 1994). Aufgrund der Schlüsselposition des Tumorsuppressors wird die Aktivität des Proteins auf transkriptioneller, translationaler und vor allem auf posttranslationaler Ebene streng kontrolliert. Zudem aktiviert p53 in einer negativen Rückkopplungsschleife die Expression der E3-Ubiquitin-Ligase Mdm2, die wiederum durch Interaktion mit dem Aminoterminus von p53 das Tumorsuppressorprotein ins Zytoplasma transportiert und es dem proteolytischen Abbau zuführt.

Die E1A-Proteine können neben der indirekten Aktivierung von p53 über pRB, E2F und p14^{ARF} die Expression des Tumorsuppressorproteins auch direkt durch die Wechselwirkung mit dem Transkriptionsfaktor ETF induzieren (Hale und Braithwaite, 1999). Neueste Beobachtungen zeigen, daß E1A auch einen direkten Einfluß auf den proteolytischen Abbau polyubiquitinylierter Proteine (z.B. p53) durch die Inhibition von Komponenten der 26S-Untereinheit des Proteosoms, der S4 und S8 ATPasen, hat (Turnell *et al.*, 2000). Auch die Wechselwirkung mit Ubc9, einem Mitglied der Ubiquitin-Konjugase-Familie, das für die kovalente Verknüpfung eines Ubiquitin-ähnlichen Proteins an Substratproteine (s. 1.3) zuständig ist, weist auf eine Beteiligung der E1A-Proteine auf die posttranslationale Modifikation zellulärer Proteine hin (Hateboer *et al.*, 1996).

Andere Beobachtungen zeigen, daß selbst in p53-negativen Zellen Apoptose durch die E1A-Proteine ausgelöst werden kann. Ein ternärer Komplex aus p300/CBP, DP1 und hyperphosphoryliertem pRB scheint hierfür verantwortlich zu sein (DeGregori *et al.*, 1997; Putzer *et al.*, 2000; Stiewe *et al.*, 2000; Wu und Levine, 1994).

Die alleinige Expression der E1A-Proteine würde also zur Auslösung der p53-abhängigen und p53-unabhängigen Apoptose führen, wenn nicht in Ad-infizierten Zellen die beiden Genprodukte der E1B-Region, E1B-19kDa und E1B-55kDa, unabhängig voneinander aber additiv diesem Prozeß gezielt entgegenwirken würden (Barker und Berk, 1987; McLorie *et al.*, 1991; White *et al.*, 1991).

1.2.3.2 E1B-19kDa

Das E1B-19kDa-Protein ist ein Mitglied der bcl-2-Familie, die sich durch eine allen gemeinsame Aminosäuresequenz, die BH3-Region (*bcl-2 homology region 3*), auszeichnet. Die Mitglieder sind entweder in der Lage, den programmierten Zelltod zu induzieren oder zu inhibieren. Aufgrund der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit zwischen E1B-19kDa und bcl-2 sind sie bei der Transformation in Kooperation mit E1A untereinander austauschbar und können beide in einem noch teilweise unbekannten Mechanismus die p53-abhängige Apoptose verhindern (Chiou *et al.*, 1994; Debbas und White, 1993; Rao *et al.*, 1992; Sabbatini *et al.*, 1995; Sabbatini *et al.*, 1995). Vermutlich spielt die Inhibition der repressorischen Aktivität von p53 auf die Expression antiapoptotischer Proteine wie z.B. bcl-2 eine wichtige Rolle (Miyashita *et al.*, 1994; Miyashita *et al.*, 1994; Shen und Shenk, 1994; Zambetti *et al.*, 1992). Der zugrunde liegende Mechanismus scheint aber nicht die direkte Interaktion zwischen E1B-19kDa und p53 zu sein. Vermutlich wird die Bindung von p53 an TBP (*TATA-box*

binding protein) oder andere basale Transkriptionsfaktoren verhindert (Hernandez, 1993; Sabbatini *et al.*, 1995).

Die antiapoptotische Wirkung von E1B-19kDa wird auch unabhängig von p53 durch die Inhibition proapoptotischer bcl-2-Familienmitglieder wie z.B. Bax, Bnip3L u.a. vermittelt, deren Funktion die Aktivierung der Caspasen CED-4/Apaf1 und CED-3/FLICE und damit die Initiation des programmierten Zelltods ist (Chinnaiyan *et al.*, 1997; Han *et al.*, 1998). Außerdem scheint das virale Protein, ähnlich wie das BHRF1-Protein von EBV, das ebenfalls zur bcl-2-Familie gehört, auch eine indirekte Schutzfunktion gegen externe und interne Apoptose-auslösende Stimuli, wie TNF- α , Fas, UV-Licht oder das Chemotherapeutikum Cisplatin, auszuüben (Chinnadurai, 1998; Gooding *et al.*, 1991; Hashimoto *et al.*, 1991; Subramanian *et al.*, 1995; Subramanian *et al.*, 1993).

Für die effiziente und vollständige Transformation nicht-permissiver Zellen ist also zusätzlich zu E1A das E1B-19kDa-Protein oder/und das E1B-55kDa-Protein (s. 1.2.3.3) notwendig. Beide Proteine wirken in Kooperation mit E1A unabhängig aber additiv (McLorie *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1992).

1.2.3.3 E1B-55kDa

Ad5 E1B-55kDa besteht aus 496 Aminosäuren und verfügt als multifunktionelles Protein ebenfalls über die Fähigkeit, E1A-induzierte, antivirale Schutzmechanismen der Zelle aufzuheben. Im Gegensatz zu E1B-19kDa tritt E1B-55kDa über zwei zentrale Domänen direkt mit dem Aminoterminus von p53 in Wechselwirkung (Abb.2; Kao *et al.*, 1990; Sarnow *et al.*, 1982; Yew *et al.*, 1990). Wahrscheinlich spielen hierbei die Aminosäuren R240 und H260 des viralen Proteins eine wichtige Rolle (Shen *et al.*, 2001).

Zahlreiche Untersuchungen zeigen, daß für das transformierende Potential des Onkoproteins von Ad5 als auch von Ad12 vornehmlich zwei Eigenschaften notwendig sind, zum einen die spezifische Interaktion mit p53, aber nicht mit p53-homologen Proteinen, wie p73 oder p51 (Wienzek *et al.*, 2000), zum anderen die Inhibition der p53-vermittelten Transkription (Yew und Berk, 1992; Yew *et al.*, 1994). Das Tumorsuppressorprotein ist Angriffspunkt zahlreicher Genprodukte diverser DNA-Viren. Analog zu Ad5 E1B-55kDa interagieren auch HBV X, HCMV UL111a, HPV 16 und HPV 18 E6 und SV40 TAg mit dem zellulären Protein und beeinflussen seine antivirale Wirkung (Ali und DeCaprio, 2001; Dell und Gaston, 2001; Doniger *et al.*, 1999; Mantovani und Banks, 2001; Mantovani und Banks, 1999; Murakami, 2001; Muralidhar *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 1999).

In Ad5-transformierten Zellen beobachtet man E1B-55kDa einerseits in einer diffusen Verteilung im Zytoplasma, andererseits lokalisiert es zusammen mit p53 und WT1, ebenfalls ein zelluläres Tumorsuppressorprotein, in einem großen, perinukleären Proteinkomplex (*perinuclear body*, *cytoplasmic body*; Zantema *et al.*, 1985; Maheswaran *et al.*, 1995; Maheswaran *et al.*, 1998; Maheswaran *et al.*, 1993; Smiley *et al.*, 1990). Möglicherweise handelt es sich bei diesem Komplex um das Zentrosom (Brown *et al.*, 1994). Gegen das Modell einer Inaktivierung von p53 durch einen E1B-55kDa-vermittelten Transport aus dem Zellkern und die Sequestrierung des Tumorsuppressorproteins im Zytoplasma sprechen aber einige Beobachtungen. In Ad12-transformierten Zellen lokalisiert E1B-54kDa, dessen Affinität zu p53 anscheinend schwächer ist, als die des verwandten Proteins von Ad5, hauptsächlich im Zellkern (Grand *et al.*, 1999). Untersuchungen der repressorischen Aktivität bezüglich der p53-Transaktivierung zeigten, daß diese genauso hoch ist wie bei Ad5 E1B-55kDa (Yew und Berk, 1992). Ein weiteres Gegenargument liefern Experimente mit einer Insertionsmutante von Ad5 E1B-55kDa an Aminosäureposition 443 (R443, Abb. 2). Diese Mutante interagiert zwar genauso wie das WT-Protein mit p53 und kolokalisiert ebenfalls mit dem zellulären Protein im *Perinuclear Body*, aber die Mutation bewirkt einen fast vollständigen Verlust der Fähigkeit, die p53 Transaktivierung zu inhibieren, oder in Kooperation mit E1A primäre Nagetierzellen zu transformieren (Yew und Berk, 1992). Demzufolge scheint es keine strikte Korrelation zwischen der Sequestrierung von p53 im Zytoplasma und der Repression der p53-vermittelten Transkription zu geben. Zusätzlichen Einfluß auf die Transformation hat neben der Repressordomäne (Abb. 2) ein carboxyterminales Endstück, das zwei Serinreste und ein Threoninrest beinhaltet (Ser-490, Ser-491, Thr-495). Durch die Konstruktion entsprechender Punktmutanten wurde gezeigt, daß die Phosphorylierung aller drei Aminosäuren sowohl für die Repressoraktivität, als auch für das transformierende Potential des viralen Proteins notwendig ist (Teodoro und Branton, 1997; Teodoro *et al.*, 1994).

Der Mechanismus der Inhibition p53-vermittelter Transaktivierung durch Ad5 E1B-55kDa war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Die Tatsache, daß das virale Protein direkt mit der aminoterminalen Transaktivatordomäne von p53 interagiert, ließ anfänglich vermuten, daß durch diese Maskierung die Wechselwirkung mit Komponenten des RNA-Polymerase II-Präinitiationskomplexes, wie z.B. TBP, TAF_{II}31, oder TFIIF, die für die Transkription p53-abhängiger Gene benötigt werden, sterisch gehindert wird (Lu und Levine, 1995; Thut *et al.*, 1995; Xiao *et al.*, 1994).

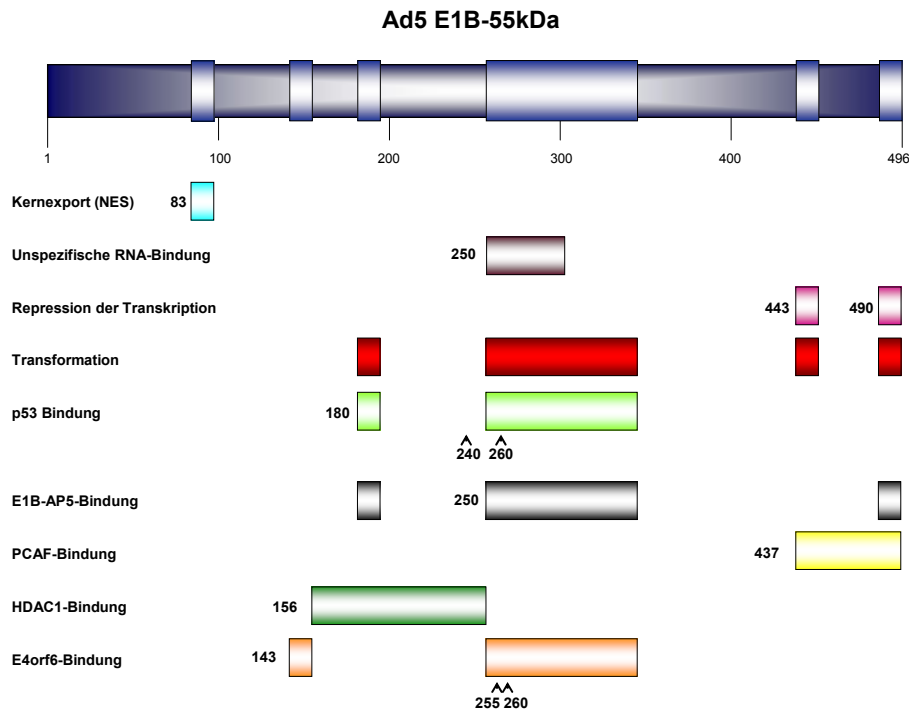


Abb. 2: Strukturelle und funktionelle Domänen des Ad5 E1B-55kDa-Proteins.

Nummern kennzeichnen jeweils die Position der ersten Aminosäure in den bekannten Motiven und Bindungsdomänen. Pfeile entsprechen der Position bereits charakterisierter Punktmutanten. Weitere Details zu den einzelnen Domänen im Text.

Neueste Erkenntnisse jedoch lassen vermuten, daß E1B-55kDa eine aktive Rolle bei der Repression der p53-Transaktivierung spielt. Fusionsproteine bestehend aus dem viralen Onkoprotein und der Gal4-DNA-Bindungsdomäne entwickeln in Reporter-*Assays* mit heterologen Promotoren, die Gal4-Bindungsstellen enthalten, eine starke transkriptionsrepressorische Aktivität (Yew *et al.*, 1994; Martin und Berk, 1998). Ad5 E1B-55kDa hat demzufolge auch unabhängig von p53 eine inhibitorische Wirkung auf die basale RNA-Polymerase II-Transkription, sofern es direkt zu den entsprechenden Promotoren transportiert wird. *In vitro* Experimente mit den gereinigten Faktoren des Transkriptions-Initiationskomplexes und Ad5 E1B-55kDa demonstrierten aber, daß für die effiziente adenovirale Repression ein zusätzlicher zellulärer Korepressor notwendig sei (Martin und Berk, 1999). Mittlerweile scheinen mehrere Veröffentlichungen diese Behauptung zu bestätigen. Interessant ist z.B. die spezifische Interaktion von Ad2 E1B-55kDa mit HDAC1 und mSin3A (Abb. 2; Punga und Akusjarvi, 2000). Es wurde gezeigt, daß alle drei Proteine als enzymatisch aktiver Komplex in der Lage sind, die Deacetylierung von Histonproteinen zu katalysieren. Es ist allgemein bekannt, daß Genexpression u.a. durch die reversible Acetylierung durch HATs (*histone acetyltransferases*) und HDACs (*histone*

deacetyltransferases) reguliert wird (Kouzarides, 1999), wobei die Rekrutierung von HDACs mit der Transkriptionsrepression assoziiert wird. Die Interaktion von mSin3A, ein globales Transkriptions-Repressorprotein, mit HDAC1 und HDAC2, scheint dafür ebenfalls notwendig zu sein (Laherty *et al.*, 1997). Trotz der Attraktivität dieser Modellvorstellung konnte aber bisher kein direkter *in vivo* Zusammenhang mit der E1B-vermittelten Inhibition der p53-Transaktivierung hergestellt werden.

Einer weiteren Acetyltransferase, PCAF (*p300/CBP-associated factor*), konnte ebenfalls die Wechselwirkung mit Ad2 E1B-55kDa, Ad12 E1B-54kDa und auch p53 nachgewiesen werden (Abb. 2; Liu *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000). Es wurde *in vivo* und *in vitro* gezeigt, daß das virale Protein die physikalische Interaktion zwischen p53 und PCAF, und somit ganz spezifisch die Acetylierung von p53 verhindert, während die Autoacetylierung oder die Acetylierung von Histonen davon unbeeinträchtigt bleibt. Als Folge der verringerten Acetylierung von p53 konnte zudem ein fast vollständiger Verlust der sequenzspezifischen DNA-Bindungsaktivität des Tumorsuppressorproteins nachgewiesen werden. Schon einige Jahre zuvor wurde gezeigt, daß die signalinduzierte Acetylierung von p53 als Reaktion auf z.B. DNA-Schäden durch verschiedene Transferasen wie CBP, p300 oder PCAF eine deutliche Steigerung der sequenzspezifischen DNA-Bindungsaktivität und somit der Transaktivierung der Transkription bewirkt (Liu *et al.*, 1999; Sakaguchi *et al.*, 1998). Auch dieses Modell könnte bei der Inaktivierung von p53 während der Ad-vermittelten zellulären Transformation oder ebenso bei der adenoviralen Replikation eine Rolle spielen, doch erst weitere Untersuchungen über den Einfluß von E1B-55kDa auf Acetyltransferasen wie PCAF oder Deacetyltransferasen wie HDAC1 werden Einblick in die biologische Funktion der zellulären Proteine im Kontext der Transformation geben.

Eine weitere wichtige Funktion von Ad5 E1B-55kDa ist die Verringerung der Halbwertszeit von p53 im Kooperation mit E4orf6 (Abb. 2; Querido *et al.*, 1997; Steegenga *et al.*, 1998). Erst vor kurzem wurde der E1B-55kDa/E4orf6-Komplex als Untereinheit eines SCF-ähnlichen Komplexes (*Skp1*, *Cdc53/Cullin*, *F box receptor*) identifiziert, dessen Funktion die Ubiquitinylierung von Proteinen ist (Querido *et al.*, 2001; Querido *et al.*, 2001). Höchstwahrscheinlich übernimmt der virale Komplex sowohl in Ad-infizierten Zellen, als auch in E1/E4orf6-transformierten Zellen (Nevels *et al.*, 2000) die Rolle von Mdm2, das ebenfalls als Bestandteil eines Ubiquitin-E3-Ligase-Komplexes die Halbwertszeit von p53 durch Anheftung von Ubiquitinresten regulieren kann (Balint und Vousden, 2001; Daujat *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2000; Honda und Yasuda, 2000; Kornitzer und Ciechanover, 2000; Lorick *et al.*, 1999). Interessanterweise enthält E4orf6 ebenso wie Mdm2 ein RING-Finger Motiv, eine

konservierte cysteinreiche Sequenz mit zinkbindenden Potential, die für die Bildung eines Ubiquitin-Ligase-Komplexes notwendig ist. Dies macht eine Beteiligung des viralen Komplexes beim proteosomalen Abbau von p53 noch wahrscheinlicher (Boyer und Ketner, 2000). Bei der Mdm2-induzierten Degradierung von p53 scheint aber der aktive Transport des Tumorsuppressorproteins aus dem Kern durch Mdm2 essentiell zu sein (Freedman und Levine, 1998; Freedman und Levine, 1999; Freedman *et al.*, 1999; Roth *et al.*, 1998).

Im Gegensatz dazu ist noch nicht geklärt, ob der adenovirale Abbau von p53 eventuell im Zellkern stattfindet (Mattsson *et al.*, 2001; Rubenwolf, 1999).

Im produktiven Infektionszyklus wird der Komplex aus E1B-55kDa und E4orf6 ebenfalls für das Abschalten der Wirtszellfunktionen (*host cell shutoff*) durch Modulation des mRNA-Metabolismus verantwortlich gemacht (zur Übersicht: Dobner und Kzhyshkowska, 2001; Täuber und Dobner, 2001). Beide Proteine sorgen in der späten Phase der Virusinfektion für den bevorzugten nukleozytoplasmatischen Export viraler mRNA, während der Transport der meisten zellulären Transkripte inhibiert wird. Für den Transport und/oder die Bindung an die RNA spielt wahrscheinlich ein kürzlich identifizierter zellulärer Interaktionspartner von E1B-55kDa, E1B-AP5, eine entscheidende Rolle (Abb. 2; Gabler *et al.*, 1998). Das Protein, das zur Familie der hnRNP-Proteine gehört und Homologien zu hnRNP-U/SAF-A besitzt, bindet tatsächlich RNA, beeinflusst den mRNA-Transport in Ad-infizierten Zellen und besitzt tumorsupprimierende Eigenschaften (Schütt, 2000). Neueste Untersuchungen weisen darauf hin, daß die Bindungsaffinität des Proteins zu RNA über Proteinmethylierung reguliert wird (Kzhyshkowska *et al.*, 2001). Die Interaktion von E1B-AP5 an TAP, einem essentiellen RNA-Exportfaktor, machen die Beteiligung des hnRNP-Proteins an der viralen Replikation noch wahrscheinlicher (Bachi *et al.*, 2000).

Trotz dieser Beobachtungen ist derzeit immer noch nicht vollständig sicher, welches virale Protein des E1B-55kDa/E4orf6-Komplexes die aktive Rolle im nukleozytoplasmatischen Transport übernimmt. Die Funktionalität eines kürzlich identifizierten nukleären Exportsignals (NES) des HIV1 Rev-Typs im E4orf6-Protein bleibt umstritten (Dobbelstein *et al.*, 1997; Weigel und Dobbelstein, 2000). Neueste Untersuchungen zur Pendelaktivität von Ad5 E1B-55kDa lassen vermuten, daß das E1-Onkoprotein selbst eine aktive Rolle beim nukleozytoplasmatischen Transport übernimmt. Ein aminoterminalen NES des HIV1 Rev-Typs vermittelt in E1B-55kDa-transfizierten Zellen unabhängig von E4orf6, p53, Mdm2, oder anderen adenoviralen Proteinen im Kontext einer Ad5-Infektion, den CRM1-abhängigen Export des viralen Proteins (Dosch *et al.*, 2001; Görlich und Kutay, 1999; Krätzer *et al.*, 2000). Ob eine unspezifische RNA-Bindungsaktivität im zentralen Bereich von Ad5 E1B-55kDa

ebenfalls eine Rolle beim nukleozytoplasmatischen Transport viraler mRNA spielt, konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden (Abb. 2; Horridge und Leppard, 1998).

Aufgrund der Tatsache, daß das virale Onkoprotein in E1-transformierten Zellen zusammen mit p53 hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist, wäre auch eine Beteiligung des nukleären Exportsignals von Ad5 E1B-55kDa bei der Transformation von nicht-permissiven Zellen denkbar. Im homologen Protein von Ad12 konnte bisher kein entsprechendes NES-Motiv detektiert werden, dafür scheint ein zentral gelegenes nukleäres Lokalisationssignal (NLS) die fast ausschließliche Kernlokalisierung in Ad12-transformierten Zellen zu erklären (Grand *et al.*, 1999). Möglicherweise ist die subzelluläre Lokalisation des großen E1B-Genprodukts für das transformierende Potential von Bedeutung.

Das Hauptangriffsziel des viralen Onkoproteins in der Ad5-induzierten Transformation jedenfalls scheint das Tumorsuppressorprotein p53 zu sein, obwohl aus Untersuchungen über die Replikation von WT- und E1B-55kDa-deletierten Adenoviren in Zellen hervorging, daß das virale Protein unabhängig von der Anwesenheit von p53 in den Zellzyklus eingreifen kann, um Zellzyklus-bedingte Restriktionen der viralen Replikation aufzuheben (Dix *et al.*, 2001; Goodrum und Ornelles, 1997; Goodrum und Ornelles, 1998; Shen *et al.*, 2001). Möglicherweise spielt die Wechselwirkung mit anderen Zellzyklus-spezifischen Faktoren auch eine Rolle in der Transformation.

1.3 POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATION DURCH SUMO-1

1.3.1 SUMO UND SUMO-SPEZIFISCHE ENZYME

SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) gehört zur Familie der Ubiquitin-ähnlichen Proteine, die durch mehrere enzymatische Schritte kovalent an ihre Zielproteine in Protozoen, Metazoen, Pflanzen und Hefen angeheftet werden (zur Übersicht: Melchior, 2000; Muller *et al.*, 2001; Seeler und Dejean, 2001; Wilson und Rangasamy, 2001; Wilson und Rangasamy, 2001; Yeh *et al.*, 2000).

Dem ursprünglich 1995 in *Saccharomyces cerevisiae* identifizierten, 101 Aminosäuren langen Protein wurden bislang von mehreren Arbeitsgruppen verschiedene Bezeichnungen verliehen (Meluh und Koshland, 1995). So ist SUMO-1 auch unter den Namen PIC1, Ubl1, Sentrin1, GMP1 und Smt3c bekannt.

Tab. 2: Ubiquitin-ähnliche Proteine und ihre möglichen Funktionen

PROTEIN	SUBSTRATE	HAUPTFUNKTION
Ubiquitin	viele	Transport multi-ubiquitinylierter Proteine zum proteosomalen Abbau (Weissman, 2001)
Nedd8/Rub1	Cullin	Regulierung der Ubiquitin E3 Ligase-Aktivität (Hochstrasser, 1998; Liakopoulos <i>et al.</i> , 1998)
Apg12p	Apg5p	Bildung des Autophagosoms in Hefe (Klionsky und Emr, 2000; Ohsumi, 2001)
Apg8p/Aut7p	Phosphatidyl-ethanolamin	Regulierung der Autophagosomengröße (Klionsky und Emr, 2000; Ohsumi, 2001)
ISG15/UCRP	unbekannt	Interferon-induziert, antivirale Reaktion? (Loeb und Haas, 1992; Yuan und Krug, 2001)
SUMO-1/ Smt3c/PIC1/Ubl1/ GMP1/Sentrin1	viele	Protein-Targeting, POD-Formierung, Ubiquitin-Antagonist (Melchior, 2000; Muller <i>et al.</i> , 2001; Seeler und Dejean, 2001; Wilson und Rangasamy, 2001; Wilson und Rangasamy, 2001)
SUMO-2/ Smt3a/Sentrin2	unbekannt	unbekannt (Kamitani <i>et al.</i> , 1998; Saitoh und Hinchey, 2000; Tatham <i>et al.</i> , 2001)
SUMO-3/ Smt3b/Sentrin3	unbekannt	unbekannt (Kamitani <i>et al.</i> , 1998; Saitoh und Hinchey, 2000; Tatham <i>et al.</i> , 2001)

Die Mitglieder der Ubiquitin-ähnlichen Proteine besitzen zahlreiche Gemeinsamkeiten (Tab. 2). Neben der mehr oder weniger großen Homologie zu Ubiquitin bezüglich der Aminosäuresequenz (z.B. SUMO-1: 18 %, ISG15/UCRP: 36 %, NEDD8: 80%) zeigten NMR Strukturanalysen eine allen gemeinsame, charakteristische $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ -Sekundärstruktur (Bayer *et al.*, 1998). Desweiteren besitzen alle am Carboxyterminus ein Doppel-Glycin-Motiv (außer Apg12p mit nur einem Glycin). Nach Abspaltung des Carboxyterminus durch eine Hydrolase wird dieses für die kovalente Verknüpfung mit den katalysierenden Enzymen und letztendlich mit dem Zielprotein exponiert. Da die SUMO-Modifikation genauso wie die Ubiquitin-Modifikation reversibel ist, übernehmen Hydrolasen neben dem Prozessieren der *precursor*-Moleküle auch die Aufgabe einer Isopeptidase (Cystein-Protease) zur Abspaltung des Proteins von seinem Zielprotein.

Für SUMO-1 konnte man bisher neun verschiedene Proteasen identifizieren. Während Ulp1 und Ulp2 das Prozessieren und die De-SUMOylierung in Hefe katalysieren, kennt man in menschlichen Zellen bereits sieben SENPs oder SUSPs (*sentrin/SUMO-specific proteases*), die sich durch eine allen gemeinsame konservierte carboxyterminale katalytische Domäne auszeichnen (Li und Hochstrasser, 1999; Li und Hochstrasser, 2000; Schwienhorst *et al.*, 2000; Yeh *et al.*, 2000). Die große Anzahl verschiedener SUMO-Proteasen weist darauf hin, daß ihre Spezifität auch durch die SUMO-Substratproteine mitbestimmt wird.

Analog zur Ubiquitinylierung verläuft auch die Modifikation durch SUMO-1 in drei Schritten (Abb. 3). Das carboxyterminale Glycin von SUMO-1 wird zuerst in einem ATP-abhängigen Schritt aktiviert und an E1 (Aktivase: Aos1/Uba2) gebunden (Schritt 1).

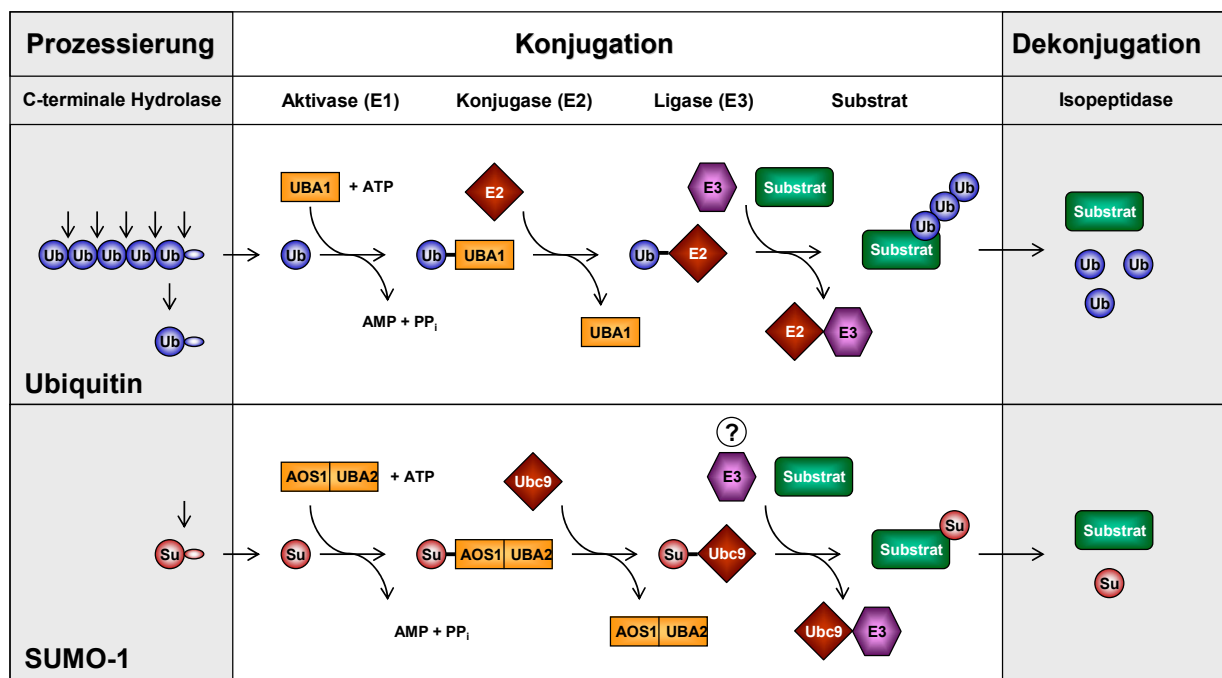


Abb. 3: Prozeß der SUMO-1-(De-)Konjugation im Vergleich mit der (De-)Ubiquitinylierung.

Die SUMO-1-Modifikation verläuft analog zur Ubiquitinylierung generell in 3 Schritten, obwohl noch nicht gesichert ist, ob für die SUMOylierung auch eine E3-Ligase notwendig ist (s. Fragezeichen). Spezifische carboxyterminale Hydrolasen/Isopeptidasen sind für das Prozessieren beider Proteine und die Abspaltung von den Zielproteinen verantwortlich (Pfeile). Im Gegensatz zur Ubiquitinylierung können aber im Fall von SUMO-1 keine Polymere an das Substrat angeheftet werden.

Anschließend wird es auf einen exponierten Cysteinrest von E2 (Konjugase: Ubc9) übertragen (Schritt 2). Im Gegensatz zur Ubiquitinylierung ist bisher noch nicht gesichert, ob für die SUMO-1-Modifikation einige kürzlich identifizierten E3-Ligasen (Schritt 3) für alle

Substratproteine notwendig sind (Hochstrasser, 2001; Jackson, 2001; Kahyo *et al.*, 2001; Pichler *et al.*, 2002; Sachdev *et al.*, 2001; Schmidt und Muller, 2002).

Zahlreiche *in vitro* Experimente zeigten, daß die Anwesenheit von E1 und E2 für die SUMOylierung vieler Substratproteine genügt bzw. Ubc9 in einigen Fällen für die Bindung an das Zielprotein und die Substratspezifität ausreichend ist.

Für die SUMO-1-Konjugation von p53, LEF1 und Sp100 jedenfalls scheint die enzymatische Aktivität substratspezifischer E3-Ligasen, wie PIAS1, PIASy oder RanBP2 essentiell zu sein (Hochstrasser, 2001; Kahyo *et al.*, 2001; Pichler *et al.*, 2002; Sachdev *et al.*, 2001; Schmidt und Muller, 2002). Im letzten Schritt der Konjugation wird die Übertragung des Carboxyterminus von SUMO-1 (oder auch -2 und -3) auf die ϵ -Aminogruppe eines Lysins im Substratprotein durch die Bildung einer Isopeptidbindung katalysiert. Durch Punktmutagenese und Sequenzvergleich aller SUMO-1-Substrate konnte eine minimale Konsensussequenz für die Konjugation ermittelt werden. Die SUMO-Akzeptor-Region enthält neben dem Lysin (K) weitere Aminosäuren, die ebenso für die Modifikation erforderlich sind. Die Konsensus-Sequenz lautet: ψ K x E. Hierbei steht ψ für eine aliphatische Aminosäure, E für Glutamat und x für eine beliebige Aminosäure. Wahrscheinlich sind aber *in vivo* weitere Domänen notwendig für die Substraterkennung bzw. Bindung des E2- oder E3-Enzyms. Dies wird auch durch die Tatsache deutlich, daß trotz der apparenten strukturellen, funktionellen und sequentiellen Homologie der E1- und E2-Enzyme, die für die Konjugation von SUMO-1 (Aos1/Uba2, Ubc9) oder Ubiquitin (Uba1, verschiedene Ubcs) notwendig sind, diese nicht untereinander austauschbar sind.

Ein wichtiger Unterschied zwischen beiden Modifikationssystemen ergibt sich außerdem aus der Beobachtung, daß ein aminoterminales Lysin im Ubiquitin-Protein die Anheftung eines weiteren Ubiquitinmoleküls durch ein E4-Enzym ermöglicht (Koegl *et al.*, 1999). Im Gegensatz zur Polyubiquitylierung konnte aber für SUMO-1 weder ein aminoterminales Lysin detektiert, noch die Anheftung von Polymeren beobachtet werden. Interessanterweise aber enthalten die nah verwandten Proteine SUMO-2 und SUMO-3 (50 % Homologie zu SUMO-1) am Aminoterminal eine typische SUMO-Akzeptorsequenz und *in vitro* konnte tatsächlich eine Aos1/Uba2/Ubc9-katalysierte Poly-SUMOylierung eines Substrats mit beiden Proteinen beobachtet werden (Kamitani *et al.*, 1998; Saitoh und Hinchey, 2000; Tatham *et al.*, 2001). Weitere Experimente, die zeigten, daß SUMO-2 auch *in vivo* in polymerer Form an Substratproteine angeheftet wird, und daß typische SUMO-1-Substrate wie RanGAP1 (s. 1.3.2) *in vivo* keine Zielproteine der SUMO-2 und -3-Modifikation sind, weisen darauf hin, daß sich

die biologischen Funktionen von SUMO-1 in der Zelle von SUMO-2 und -3 unterscheiden müssen.

Während die Anzahl aller identifizierten SUMO-1-Substrate im Lauf der letzten Jahre zugenommen hat, und man dadurch immer mehr Informationen über die tatsächliche Funktion der SUMO-1-Modifikation gewonnen hat (s. 1.3.2), ist vollkommen offen, welche biologische Funktion SUMO-2 und SUMO-3 in der Zelle übernehmen.

1.3.2 ZIELPROTEINE UND MÖGLICHE FUNKTIONEN DER SUMO-1-MODIFIKATION

1.3.2.1 Zelluläre Substratproteine

Aufgrund intensiver Erforschung einer wachsenden Anzahl von eukaryotischen SUMO-1-Substratproteinen lassen sich die einzelnen biologischen Funktionen auf einige wenige Gemeinsamkeiten zusammenfassen. Im Gegensatz zu Ubiquitin, dessen Aufgabe die Markierung von Proteinen zum proteolytischen Abbau ist (Ciechanover, 1998; Kornitzer und Ciechanover, 2000; Weissman, 2001), bewirkt die kovalente Bindung von SUMO-1 hauptsächlich eine veränderte Affinität zu anderen zellulären Proteinen. Dies hat in vielen Fällen ein *Targeting* des Proteins zur Folge bzw. verändert die subzelluläre Lokalisation des modifizierten Proteins (zur Übersicht: Melchior, 2000; Muller *et al.*, 2001; Seeler und Dejean, 2001; Wilson und Rangasamy, 2001; Wilson und Rangasamy, 2001; Yeh *et al.*, 2000). Eine Ausnahme bilden zwei zelluläre Substrate, Mdm2 und I κ B α : Ein Lysinrest scheint hier Akzeptorstelle sowohl für die Isopeptidbindung mit Ubiquitin als auch mit SUMO-1 zu sein. Die SUMO-1-Modifikation als Antagonist der Ubiquitylierung kann also bei beiden Substratproteinen den Abbau verhindern (Tab. 3). Im Falle von I κ B α , das normalerweise als Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF- κ B fungiert, bedeutet dies eine Stabilisierung und die konsequente Reduktion der Transkriptionsaktivität von NF- κ B. Ebenso führt die SUMO-1-Konjugation der Ubiquitin-E3-Ligase Mdm2 zur Stabilisierung. Als Folge kommt es zu einem vermehrten proteolytischen Abbau von p53. Interessanterweise zählt auch das Tumorsuppressorprotein zu den Substraten von SUMO-1. Über die mögliche Funktion gibt es aber trotz Hinweise auf eine transkriptionssteigernde Wirkung widersprüchliche Ergebnisse (Tab. 3).

Tab. 3: Zelluläre Zielproteine der SUMO-1-Modifikation und die möglichen Funktionen

PROTEIN	FUNKTION	ROLLE DER SUMO-1-MODIFIKATION
Säugetier		
RanGAP1	Kernimport	Vermittelt Interaktion mit RanBP2 (Mahajan <i>et al.</i> , 1997; Mahajan <i>et al.</i> , 1998; Matunis <i>et al.</i> , 1996; Matunis <i>et al.</i> , 1998; Saitoh <i>et al.</i> , 1998)
PML	Tumorsuppressorprotein	Induziert die Bildung der PODs und die Rekrutierung von Daxx und p53 zu den PODs (Duprez <i>et al.</i> , 1999; Everett <i>et al.</i> , 1999; Ishov <i>et al.</i> , 1999; Kamitani <i>et al.</i> , 1998; Li <i>et al.</i> , 2000; Muller <i>et al.</i> , 1998; Seeler und Dejean, 2001; Sternsdorf <i>et al.</i> , 1997; Zhong <i>et al.</i> , 2000)
Sp100	Regulation der Chromatinstruktur (?)	Vermittelt die Interaktion mit HP1? (Negorev <i>et al.</i> , 2001; Sternsdorf <i>et al.</i> , 1999; Sternsdorf <i>et al.</i> , 1997)
p53	Tumorsuppressorprotein	Aktivierung der p53 Transaktivierung und der Apoptose (Fogal <i>et al.</i> , 2000; Gostissa <i>et al.</i> , 1999; Gottifredi und Prives, 2001; Kahyo <i>et al.</i> , 2001; Kwek <i>et al.</i> , 2001; Rodriguez <i>et al.</i> , 1999)
p73	p53-Homolog	Unbekannt (Minty <i>et al.</i> , 2000)
HIPK2	Transkriptions-Korepressor	Vermittelt die Lokalisation von HIPK2 in den PODs (Kim <i>et al.</i> , 1999)
TEL	Transkriptionsrepressor	Vermittelt die Lokalisation von TEL in den PODs (Chakrabarti und Nucifora, 1999; Chakrabarti <i>et al.</i> , 2000)
c-Jun	Transkriptionsaktivator	Leichte Reduktion der Transkriptionsaktivität von c-Jun (Muller <i>et al.</i> , 2000)
Androgenrezeptor	Transkriptionsaktivator	Reduktion der Transkriptionsaktivität des Androgenrezeptors (Poukka <i>et al.</i> , 1999; Poukka <i>et al.</i> , 2000)
IκBα	Signaltransduktion, NFκB-Inhibitor	Inhibition der Ubiquitinylierung von IκBα, Repression der NF-κB-Aktivität (Desterro <i>et al.</i> , 1998)
Mdm2	E3 Ubiquitin Ligase für p53	Inhibition der Ubiquitinylierung von Mdm2, Aktivierung der E3-Aktivität von Mdm2 (Buschmann <i>et al.</i> , 2000; Buschmann <i>et al.</i> , 2001; Melchior und Hengst, 2000)
LEF1	Transkriptionsfaktor	Vermittelt die Lokalisation von LEF1 in den PODs (Sachdev <i>et al.</i> , 2001)
Topo I/Topo II	DNA-Replikation/ DNA-Reparatur	Unbekannt (Mao <i>et al.</i> , 2000; Mao <i>et al.</i> , 2000)

WRN	DNA-Helikase (RecQ-Familie)	Unbekannt (Kawabe <i>et al.</i> , 2000)
RanBP2	Bestandteil des NPCs (<i>nuclear pore complex</i>)	E3-SUMO-1-Ligase für Sp100 (Mahajan <i>et al.</i> , 1997; Pichler <i>et al.</i> , 2002; Saitoh <i>et al.</i> , 2002; Saitoh <i>et al.</i> , 1998)
GLUT1/GLUT 4	Glukose Transport	Unbekannt (Giorgino <i>et al.</i> , 2000)
c-Myb	Transkriptionsfaktor	Transkriptionsrepression (Bies <i>et al.</i> , 2002)
<i>Drosophila</i>		
Tkt 69	Transkriptionsrepressor	Unbekannt (Lehembre <i>et al.</i> , 2000)
Dorsal	Signaltransduktion, Transkriptionsfaktor	Aktiviert den Kernimport und die Aktivität von Dorsal (Bhaskar <i>et al.</i> , 2002)
CaMK	Calcium/Calmodulin- abhängige Kinase	Unbekannt (Long und Griffith, 2000)
<i>Hefe</i>		
Septine	Bildung des Knospungsringes	Regulation der Dynamik des Knospungsringes während der Zytokinese (Johnson und Blobel, 1999; Johnson und Gupta, 2001; Takahashi <i>et al.</i> , 1999; Takahashi <i>et al.</i> , 2001; Takahashi <i>et al.</i> , 2001)

Das erste identifizierte Zielprotein von SUMO-1 war RanGAP1 (*Ran GTPase-activating protein*), ein Faktor, der für den nukleozytoplasmatischen Transport von Proteinen über die Kernporenkomplexe (NPCs; *nuclear pore complexes*) erforderlich ist. Es konnte gezeigt werden, daß erst die SUMOylierung von RanGAP1 die Bindung an RanBP2, einem festen Bestandteil der NPCs, und somit den Kernimport verschiedener Proteine ermöglicht. Im Falle von Sp100, einem weiteren SUMO-1-Substrat (Tab. 3), konnte sogar bewiesen werden, daß RanBP2 als E3-Ligase mit Ubc9 interagiert, den SUMO-1-Transfer von Ubc9 auf Sp100 katalysiert und anschließend den nukleären Import des Transkriptionsfaktors ermöglicht. Ob die SUMOylierung von Sp100 oder anderer Proteine eine allgemeine Voraussetzung für den nukleären Import ist, muß noch geklärt werden.

Für eine Reihe weiterer Substratproteine spielt die SUMO-1-Konjugation beim Protein-*Targeting* eine große Rolle. Die SUMOylierung von PML, einem Tumorsuppressorprotein, bewirkt eine Sequestrierung des Proteins in subnukleären Proteinkomplexen (PODs, PML *oncogenic domains*) und die Rekrutierung weiterer zellulärer Faktoren wie z.B. SUMO-1-modifiziertes Sp100, TEL, LEF1, HIPK2 oder Daxx (Tab. 3).

Eine weitere Auswirkung der SUMOylierung ist der Einfluß auf die Aktivität einiger Transkriptionsfaktoren wie z.B. Dorsal (Homolog von NF- κ B in *Drosophila*), Sp100, c-Jun, c-Myb oder dem Androgenrezeptor (Tab. 3). Ob eine dadurch verursachte veränderte Stabilität oder eine veränderte Affinität der Proteine zu weiteren zellulären Faktoren für die Steigerung (Dorsal und Sp100) oder Repression (c-Jun, c-Myb und Androgenrezeptor) der Transkriptionsaktivität eine Rolle spielt, muß noch weiter untersucht werden.

1.3.2.2 Virale Substratproteine

Die posttranslationale SUMO-1-Modifikation wichtiger zellulärer Faktoren und die damit verbundene Veränderung der Aktivität und/oder Lokalisation nimmt wahrscheinlich eine zentrale Stellung in der Regulation wichtiger Zellfaktoren ein. Unterstützt wird diese Behauptung durch die Tatsache, daß auch frühe virale Proteine einiger DNA-Viren die zelluläre SUMOylierung beeinflussen oder selbst durch das Protein modifiziert werden (Tab. 4). Obwohl teilweise noch vollkommen unklar ist, welche Funktion die SUMO-1-Konjugation einiger viraler Protein im Kontext der viralen Replikation spielt, so gibt es einige Hinweise, die zeigen, daß dadurch analog zu zellulären Proteinen Transkriptionsaktivität (CMV IE2?) und/oder subzelluläre Lokalisation (HPV/BPV E1, CMV IE1) der frühen viralen Faktoren beeinflusst werden. Außerdem wurde beobachtet, daß die SUMOylierung von z.B. CMV IE1 oder EBV BZLF1 mit dem Verlust der SUMO-1-Modifikation von PML und mit einer Umorganisation nukleärer Proteinkomplexe (PODs) korreliert.

Tab. 4: Virale Zielproteine der SUMO-1-Modifikation und die möglichen Funktionen

PROTEIN	FUNKTION	ROLLE DER SUMO-1 MODIFIKATION
CMV IE1	Sehr frühes, virales Regulationsprotein	Unbekannt, korreliert mit dem Verlust der SUMO-1-Modifikation von PML (Muller und Dejean, 1999)
CMV IE2	Sehr frühes, virales Regulationsprotein	Reduktion der Transaktivierung, Kontrolle der Mitose/Meiose? (Heider <i>et al.</i> , 2002; Hofmann <i>et al.</i> , 2000; Spengler <i>et al.</i> , 2002)
EBV BZLF1	Sehr frühes, virales Regulationsprotein	Unbekannt, korreliert mit dem Verlust der SUMO-1-Modifikation von PML (Adamson und Kenney, 2001)
HPV/BPV E1	DNA-Helikase, Initiation der viralen Replikation	Regulation des Kernimports von E1 (Rangasamy <i>et al.</i> , 2000)

Im Fall von BPV führt die virale SUMOylierung dazu, daß die Viren durch eine Lysin-Punktmutation in der SUMO-1-Konsensus-Sequenz von E1 nicht mehr in der Lage sind zu replizieren (Rangasamy und Wilson, 2000; Rangasamy *et al.*, 2000).

Adenovirale Proteine konnten bisher noch nicht mit der SUMO-1-Konjugation in Zusammenhang gebracht werden, obwohl berichtet wurde, daß die E1A-Proteine mit der SUMO-Konjugase Ubc9 wechselwirken können (Hateboer *et al.*, 1996). Überdies scheint die adenovirale Protease L3 zahlreiche Homologien zu SUMO-spezifischen Proteasen (s.1.3.1) zu haben (Li und Hochstrasser, 1999).

In Anbetracht der Tatsache, daß zahlreiche zelluläre Faktoren, die bei der Bildung antiviraler Schutzmechanismen beteiligt sind, selbst durch posttranslationale SUMO-1-Modifikation reguliert werden, ist es verständlich, daß auch Viren Wege gefunden haben, das zelluläre SUMOylierungs-System zu beeinflussen.

1.4 AUFGABENSTELLUNG

Das E1B-55kDa-Genprodukt von Ad5 ist ein multifunktionelles Polypeptid, das auf allen Ebenen der Genexpression in die zelluläre Proliferationskontrolle eingreift. E1B-55kDa inhibiert die Vorgänge der p53-regulierten Transkription, moduliert den nukleären Transport zellulärer und später viraler mRNAs und verändert die Kontrolle der zellulären und viralen Proteinbiosynthese im Zytoplasma. Diese Aktivitäten sind teilweise eng mit seinen transformierenden Eigenschaften gekoppelt und werden über ein umfassendes Netzwerk unterschiedlicher Proteinwechselwirkungen mit zellulären und viralen Faktoren vermittelt. An erster Stelle steht dabei die Modulation der Funktion und Stabilität des Tumorsuppressorproteins p53. Als weitere Faktoren werden Proteinwechselwirkungen mit noch unbekannten zellulären Polypeptiden sowie eine intrinsische nukleozytoplasmatische Pendelaktivität vermutet.

Das Ziel dieser Arbeit war es, das Verständnis über die transformierenden Eigenschaften des E1B-55kDa-Proteins zu erweitern. Durch Mutationsanalysen sollten zunächst weitere Bereiche im viralen E1B-Protein identifiziert werden, die zur vollständigen Transformation primärer Rattennierenzellen beitragen. Dabei sollte auch der Frage nachgegangen werden, ob die nukleozytoplasmatische Pendelaktivität des Ad5-Proteins eine wichtige Funktion im E1A/E1B-vermittelten Transformationsprozeß primärer Zellen einnimmt. Schließlich sollte auf der Grundlage dieser Ergebnisse die Aufgabe der identifizierten Bereiche in der Modulation der zellulären Wachstumskontrollmechanismen durch funktionelle Studien aufgeklärt werden. Insgesamt sollten diese Arbeiten zu neuen Erkenntnissen führen, die zur Tumorentstehung beitragen und gleichzeitig das Verständnis über die Rolle von viralen Onkoproteinen in der Modulation zellulärer Wachstumskontrollmechanismen erweitern.

2 MATERIAL

Soweit nicht anders aufgeführt, stammen alle verwendeten Antikörper, Oligonukleotide, Plasmide, Vektoren, Zellen und Zelllinien aus der Sammlung der Arbeitsgruppe.

2.1 ZELLEN

2.1.1 SÄUGERZELLINIEN

Tab. 5: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien.

ZELLINIE	BESCHREIBUNG
MCF7	Zelllinie aus einem menschlichen Mammakarzinom, die WT-p53 enthält (Soule <i>et al.</i> , 1973).
H1299	Zelllinie aus einem humanen Lungenkarzinom, die kein p53 exprimiert (Mitsudomi <i>et al.</i> , 1992).
2A6	Murine Hybridomzelllinie, die monoklonale Antikörper gegen das E1B-55kDa Protein von Ad5 produziert (Sarnow <i>et al.</i> , 1982).
pAb421	Hybridom aus der Maus zur Produktion monoklonaler Antikörper gegen das Tumorsuppressorprotein p53 (Harlow <i>et al.</i> , 1981).
BRK1	Spontan immortalisierte Rattennieren-Zelllinie, die WT-p53 exprimieren.
BRK	Primäre Rattennierenzellen aus 5 – 6 Tage alten <i>Sprague-Dawley</i> -Ratten.
B6	Hybridomzelllinie aus der Maus, die monoklonale Antikörper gegen das E2A-72kDa Protein (DBP) von Ad5 produziert (Reich <i>et al.</i> , 1983).
12CA5	Murine Hybridomzelllinie, die monoklonale Antikörper gegen das Nonapeptid YPYDVPDYA aus dem Hämagglutinin des humanen Influenza-Virus produziert (Niman <i>et al.</i> , 1983).

Tab. 6: Folgende Zelllinien wurden nach Transfektion von primären BRKs mit den aufgeführten adenoviralen Genprodukten aus transformierten *Foci* etabliert.

ZELLINIE	TRANSFEKTION	EXPRESSION
A4	pE1A12S	Ad5 E1A 12S
AB15	pE1A, pE1B-K104R-NES	Ad5 E1A, Ad5 E1B-K104R-NES
AB18	pE1A, pE1B-NES	Ad5 E1A, Ad5 E1B-NES
AB19	pE1A, pE1B-K104R	Ad5 E1A, Ad5 E1B-K104R
AB38	pE1A, pE1B-WT	Ad5 E1A, Ad5 E1B-55kDa-WT
AB115	pE1A, pE1B-NES	Ad5 E1A, Ad5 E1B-NES
AB116	pE1A, pE1B-NES	Ad5 E1A, Ad5 E1B-NES
AB120	pE1A, pE1B-WT	Ad5 E1A, Ad5 E1B-55kDa-WT
AB121	pE1A, pE1B-WT	Ad5 E1A, Ad5 E1B-55kDa-WT
AB478	pE1A, pAd12 E1B-WT	Ad5 E1A, Ad12 E1B-54kDa
AB479	pE1A, pAd12 E1B-WT	Ad5 E1A, Ad12 E1B-54kDa

2.1.2 BAKTERIENSTÄMME

DH5 α und XL1-Blue sind *E.coli* K12 Derivate. DH5 α stammt aus der Sammlung der Arbeitsgruppe, XL1-Blue wurde von der Firma STRATAGENE bezogen.

- DH5 α *supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80 *lac* Z Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*; Hanahan, 1983.
- XL1-Blue *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*, *supE44*, *lac*, [F'*proAB*, *lacI*^qZ Δ M15, Tn10 (*tet*^r); Bullock, 1987]

2.1.3 VIREN

In dieser Arbeit verwendete Adenoviren (Ad):

H5wt300 (WT, Subgenus C, Serotyp 5).

2.2 NUKLEINSÄUREN

2.2.1 OLIGONUKLEOTIDE

Die folgenden Oligonukleotide wurden als Startermoleküle für PCR-Amplifikationen, zur Einführung von Mutationen durch PCR und für Sequenzreaktionen verwendet. Sie wurden von der Firma METABION bezogen. Zusätzlich angegeben ist die Nummer des Oligonukleotids in der *Filemaker Pro* Datenbank der Arbeitsgruppe.

Tab. 7: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

#	NAME	SEQUENZ (5' - 3')	VERWENDUNG
64	E1B-fw	CGC GGG ATC CAT GGA GCG AAG AAA CCC ATC TGA GC	Sequenzierung von E1B-55kDa-Mutanten
161	Sp6	CAT ACG ATT TAG GTG ACA CTA TAG	3'-Sequenzierung von pcDNA3-Insertionen
112	E1B-1197- 1215	GGG TAA CAG GAG GGG GGT G	Sequenzierung von E1B-55kDa-Mutanten
252	T7-neu	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC	5'-Sequenzierung von pcDNA3-Insertionen
592	E1B-55- SU-fw	CTA AAG GGG GTA AGG AGG GAG CGG GGG	K104R-Mutagenese in E1B-55kDa
593	E1B-55- SU-rev	CCC CCG CTC CCT CCT TAC CCC CTT TAG	K104R-Mutagenese in E1B-55kDa
594	E1B-55- NESfw	GTG GCT GAA GCG TAT CCA GAA GCG AGA CGC ATT GCG ACA ATT ACA	NES-Mutagenese in E1B-55kDa
595	E1B-55- NESrev	TGT AAT TGT CGC AAT GCG TCT CGC TTC TGG ATA CGC TTC AGC CAC	NES-Mutagenese in E1B-55kDa
695	Fwd-SU1- Ad12	GAT AGA GAT AGG CAG GAA AAA AAA GAA AG	K88R-Mutagenese in Ad12 E1B-54kDa
696	Rev-SU1- Ad12	CTT TCT TTT TTT TCC TGC CTA TCT CTA TC	K88R-Mutagenese in Ad12 E1B-54kDa
697	Fwd-SU2- Ad12	GAT AAG CAG GAA AGA AAA GAA AGT TTA AAG G	K91R-Mutagenese in Ad12 E1B-54kDa
698	Rev-SU2- Ad12	CCT TTA AAC TTT CTT TTC TTT CCT GCT TAT C	K91R-Mutagenese in Ad12 E1B-54kDa

701	Fwd-SU-Seq	CGG AAC CCT GCG GTG GTG GAG	5'-Sequenzierung von Ad12 E1B-54kDa-Mutationen
789	Fwd-E1B-V103D	GCT AAA GGG GGA TAA GAG GGA GC	V103 D-Mutagenese in E1B-55kDa
790	Rev-E1B-V103D	CGA TTT CCC CCT ATT CTC CCT CG	V103 D-Mutagenese in E1B-55kDa
875	Fwd-Ad12-D87V	GAT GAT AGA GTA AAG CAG GAA AAA AAA GAA AG	D87V-Mutagenese in Ad12 E1B-54kDa
876	Rev-Ad12-D87V	CTT TCT TTT TTT TCC TGC TTT ACT CTA TCA TC	D87V-Mutagenese in Ad12 E1B-54kDa

2.2.2 PLASMIDE

Der Vektor pcDNA3 wurde von der Firma INVITROGEN bezogen. Alle anderen verwendeten Plasmide wurden der Sammlung der Arbeitsgruppe entnommen, von anderen Arbeitsgruppen freundlicherweise zur Verfügung gestellt oder im Rahmen dieser Arbeit hergestellt.

Tab. 8: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

#	BEZEICHNUNG, PLASMID	INSERT	VEKTOR
2	pC53-SN3	Humane p53 cDNA	pCMV/neo
96	pE1A12S	Ad5 E1A 12S	pcDNA3
291	pGal-E1B-WT	Ad5 E1B-55kDa	pSG424
375	pGL-GalTK-Luc	HSV TK Promotor, Gal-Bindungsdomäne	pGL-2 basic
499	pRE-Luc	CMV-Promotor, fünf p53-Bindungsdomänen	pGL-2 basic
737	pE1A	Ad5 E1A	pML
942	pSUMO-1	SUMO-1	pcDNA3
1015	pE1B-WT	Ad5 E1B-55kDa	pcDNA3
1022	pE1B-K104R	Ad5 E1B-55kDa	pcDNA3
1023	pE1B-NES	Ad5 E1B-55kDa	pcDNA3
1024	pRex/p21-GFP	Rex/p21-GFP	pF143
1083	pGal-E1B-NES	Ad5 E1B-55kDa	pSG424

1031	pE1B-R443	Ad2 E1B-55kDa	pcDNA3
1095	pF143-Rex/p21	HTLV I Rex/p21	pF143
1097	pE1B-K104R-NES	Ad5 E1B-55kDa	pcDNA3
1120	pHA-SUMO-1	HA-SUMO	pcDNA3
1128	pGal-E1B-K104R	Ad5 E1B-55kDa	pSG424
1129	pGal-E1B-K104R-NES	Ad5 E1B-55kDa	pSG424
1131	pAd12 E1B-gfp	Ad12 E1B-54kDa	pF143
1132	pcflu-SUMO-1-GG	SUMO-1	pcDNA3
1134	pFLAG-Ubc9	hUbc9	pcDNA3
1137	pAd12 E1B-WT	Ad12 E1B-54kDa	pcDNA3
1174	pE1B-V103D	Ad5 E1B-55kDa	pcDNA3
1178	pGal-E1B-V103D	Ad5 E1B-55kDa	pSG424
1201	pAd12 E1B-K88R	Ad12 E1B-54kDa	pcDNA3
1203	pHA-SUMO-2-GG	SUMO-2	pcDNA3
1204	pHA-SUMO-3-GG	SUMO-3	pcDNA3
1206	pAd12 E1B-K91R	Ad12 E1B-54kDa	pcDNA3

2.3 ENZYME, REAGENTIEN UND NACHWEISSYSTEME

Tab. 9: In dieser Arbeit verwendete Enzyme, Reagentien, *Kits* und Nachweissysteme

FIRMA	PRODUKT
SIGMA	<ul style="list-style-type: none"> Protein-A-Sepharose CL-4B Jodacetamid DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol)
BIORAD	<ul style="list-style-type: none"> <i>Broad Range Protein Standards</i> <i>BIO-RAD Protein-Assay</i>
ROCHE	<ul style="list-style-type: none"> Protease Inhibitor Cocktail Tabletten <i>Rapid DNA Ligation Kit</i> Restriktionsenzyme Taq-DNA-Polymerase/ Pwo-DNA Polymerase Kollagenase/Dispase
CALBIOCHEM	<ul style="list-style-type: none"> MG132 (Carbobenzoxymethyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal)
NEW ENGLAND BIOLABS (NEB)	<ul style="list-style-type: none"> Restriktionsenzyme

NOVARTIS (DR. B. WOLFF)	<ul style="list-style-type: none"> • Leptomycin B (LMB)
MACHEREY-NAGEL	<ul style="list-style-type: none"> • Nucleobond AX100 und 500 Plasmid <i>Midi Kit</i> • <i>N Extract Spin Columns</i>
QIAGEN	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Qiagen Gel Extraction Kit</i>
STRATEGENE	<ul style="list-style-type: none"> • <i>QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit</i>
PROMEGA	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Dual-Luciferase® Reporter Assay System</i>
PIERCE	<ul style="list-style-type: none"> • SuperSignal® West Pico <i>Chemoluminescence Substrate</i>
GIBCO	<ul style="list-style-type: none"> • G418 (Geneticin)
INVITROGEN	<ul style="list-style-type: none"> • <i>TOPO-TA-Cloning Kit</i>

2.4 ANTIKÖRPER

2.4.1 PRIMÄRANTI-KÖRPER

Tab. 10: In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper

ANTI-KÖRPER	BESCHREIBUNG
2A6	Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen das E1B-55kDa-Protein von Ad5 (Sarnow <i>et al.</i> , 1982).
9C10	Monoklonaler Antikörper aus der Ratte gegen das E1B-55kDa-Protein aus Ad5 (Zantema <i>et al.</i> , 1985).
12CA5	Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen das Nonapeptid YPYDVDPDYA aus dem Hämagglutinin-Protein des humanen Influenzavirus (ROCHE)
3F10	Monoklonaler Ratten-Antikörper gegen das HA-Epitop (ROCHE)
pAB421	Panspezifischer, monoklonaler Maus-Antikörper gegen ein carboxyterminales Epitop von p53 (Harlow <i>et al.</i> , 1981).
5E10	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das PML-Protein (akute promyelozytische Leukämie; Stuurman <i>et al.</i> , 1992).
21C7	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das SUMO-1-Protein (ZYMED LABORATORIES)

XPH9	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das E1B-54kDa-Protein von Ad12 (Merrick <i>et al.</i> , 1991).
B6	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das E2A-72kDa-Protein von Ad5 (Reich <i>et al.</i> , 1983).
Anti-Flag M2	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen Flag-Fusionsproteine (SIGMA).

2.4.2 SEKUNDÄRANTIKÖRPER

- Anti-Maus Ig, Meerrettich-Peroxidase (HRP; *horseradish peroxidase*) gekoppelter Antikörper (Schaf; AMERSHAM LIFE SCIENCE)
- Anti-Ratte Ig, Meerrettich-Peroxidase (HRP; *horseradish peroxidase*) gekoppelter Antikörper (Esel; AMERSHAM LIFE SCIENCE)
- Anti-Maus IgG (H+L) Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-AffiniPure F(ab')₂-Fragment (Ziege; DIANOVA)
- Anti-Ratte IgG (H+L) Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-AffiniPure F(ab')₂-Fragment (Ziege; DIANOVA)
- Anti-Maus IgG (H+L) Texas Red (TR)-AffiniPure F(ab')₂-Fragment (Ziege; DIANOVA)
- Anti-Ratte IgG (H+L) Texas Red (TR)-AffiniPure F(ab')₂-Fragment (Ziege; DIANOVA)

2.5 HÄUFIG VERWENDETE PUFFER

PBS	140 mM NaCl 3 mM KCL 4 mM Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,0–7,7
RIPA-Lysispuffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0 150 mM NaCl 5 mM EDTA 1 % NP-40 0,5 % DOC 0,1 % SDS
RIPA- <i>light</i>	statt 0,5 % DOC (s.o.): 0,1 % Triton X-100
NP-40-Lysispuffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0 150 mM NaCl 5 mM EDTA 0,15 % NP-40

2.6 CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIAL

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen AMERSHAM (Braunschweig), BACHEM (Heidelberg), BACHOFER LABORATORIUMSGERÄTE (Reutlingen), BECTON DICKINSON (Heidelberg), BIO 101 (Vista/CA, USA), BIOMETRA (Göttingen), BIOMOL (Hamburg), BIORAD LABORATORIES (München), BIOZYM (Hameln), ROCHE (Basel), CALBIOCHEM (Schwalbach), COSTAR (Cambridge/MA, USA), DIANOVA (Hamburg), DU PONT (Bad Homburg), ENERGENE (Regensburg), EPPENDORF (Hamburg), FALCON (Heidelberg), FLUKA (Buchs, Schweiz), GIBCO BRL (Neu-Isenburg),

GREINER LABORTECHNIK (Frickenhäusen), HAEREUS INSTRUMENTS (Hanau), HETTICH (Tuttlingen), HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS (San Francisco/CA, USA), HOELZL (Dorfen), KONTRON INSTRUMENTS (Neufahrn), ICN (Meckenheim), MERCK (Darmstadt), MILLIPORE (Eschborn), MWG BIOTECH (München), NUNC (Roskilde, Dänemark), PHARMACIA (Freiburg), PERKIN ELMER (Norwalk/CT, USA), PIERCE (Rockford/IL, USA), QIAGEN (Düsseldorf), RIEDEL-DE HAEN (Seelze), ROBBINS SCIENTIFIC (Sunnyvale/CA, USA), ROTH (Karlsruhe), SARSTEDT (Nürnberg), SCHLEICHER&SCHUELL (Dassel), SCHOTT (Mainz), SERVA (Heidelberg), SIGMA (Deisenhofen), UPSTATE BIOTECHNOLOGY (Lake Placid/NY, USA) und WHATMAN (Maidstone, UK) bezogen.

2.7 GRÖßEN- UND MOLEKULARGEWICHTSMARKER

Zur Bestimmung der Größe doppelsträngiger, linearer DNA-Moleküle in Agarosegelen wurde die 1 kb *DNA-Ladder* (GIBCO BRL) mit Fragmenten folgender Länge verwendet:

12.216 - 11.198 - 10.180 - 9.162 - 8.144 - 7.126 - 6.108 - 5.090 -
4.072 - 3.054 - 2.036 - 1.636 - 1.018 - 517 - 506 - 396 - 344 -
298 - 220 - 201 - 154 - 134 - 75 bp

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen bei der PAGE wurde der *Broad Range Marker* (BIORAD) verwendet. Darin enthaltene Proteine haben folgende Molekulargewichte:

200 - 116 - 97 - 66 - 45 - 30 - 15 - 7,5 kDa

2.8 COMPUTERPROGRAMME UND DATENBANKEN

Texte und Tabellen wurden mit Microsoft Office XP pro (MICROSOFT) auf einem IBM-kompatiblen Computer erstellt. Zeichnungen, Diagramme und Abbildungen wurden mit den Programmen Corel Draw 8.0, Corel Photo Paint 8.0 (COREL SYSTEMS), Adobe Illustrator 8.0 und Adobe Photoshop 8.0 (ADOBE) angefertigt. Die Auswertung der DNA-Sequenzen erfolgte

mit dem Programm SeqEd™ 1.0.3 (APPLIED BIOSYSTEMS) oder mit BioEdit 4.8.5. Homologie- und Motivsuche wurde mit den Programmen FASTA, MOTIFS, BESTFIT, BLAST aus dem Softwarepaket UWGCG (GENETICS COMPUTER GROUP) sowie mit Hilfe des BLAST-Servers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; BIOTECHNOLOGY INFORMATION CENTER) durchgeführt. Für Literatursuchen wurden die MEDLINE-Datenbank (NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE) unter der Adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/> benutzt. Das Literaturverzeichnis wurde mit dem Programm EndNote 3.0 für Windows (NILES SOFTWARE) erstellt.

3 METHODEN

3.1 BAKTERIEN

3.1.1 KULTURBEDINGUNGEN UND LAGERUNG

3.1.1.1 Plattenkulturen

Auf LB-Agarplatten, die entsprechende Antibiotika enthielten, wurden Reinigungsausstriche durchgeführt. Dabei wurden die Bakterien mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers von einer Bakterienkolonie, einer Flüssigkultur oder aus einer Glycerinkultur auf die Agarplatte aufgetragen und nach Inkubation bei 37°C über Nacht konnten Einzelkolonien isoliert werden. Die Plattenkulturen bleiben bei 4°C mehrere Wochen haltbar.

3.1.1.2 Flüssigkulturen

Für die Anzucht von *E. coli* in Flüssigkultur wurde steriles LB- oder TB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und in Gegenwart entsprechender Antibiotika über Nacht bei 37°C und 150–220 rpm aerob in einem Inkubationsschüttler (NEW BRUNSWICK) inkubiert. Im Bedarfsfall wurde die Bakterienkonzentration photometrisch, bei einer Wellenlänge von 600 nm, gegen das Medium bestimmt ($1 \text{ OD}_{600} = 8 \times 10^8 \text{ Zellen/ml}$).

3.1.1.3 Glycerinkulturen

Zur dauerhaften Aufbewahrung von *E. coli*-Kulturen wurden 2 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert und in 1 ml LB/Glycerin (1:1) aufgenommen. Nach Überführung in CryoTubesTM wurden die Bakterien bei -80°C gelagert.

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

TB-Medium	12 g/l	Trypton
	24 g/l	Hefeextrakt
	4 g/l	Glycerin
	10 % (v/v)	Phosphatpuffer (KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄)

Antibiotikastammlösungen:

Ampicillin (1.000x)	100 mg/ml in H ₂ O _{bid}
Kanamycin (200x)	10 mg/ml in in H ₂ O _{bid}
Chloramphenicol (1.000x)	34 mg/ml in EtOH
Tetracyclin (500x)	5 mg/ml in EtOH
Gentamycin (1.000x)	7 mg/ml in in H ₂ O _{bid}

3.1.2 TRANSFORMATION VON *E. COLI* NACH DER RUBIDIUMCHLORID-METHODE

Die chemische Transformation von *E. coli* erfolgte modifiziert nach Hanahan (Hanahan, 1983). Ausgehend von einer Einzelkolonie des gewünschten Bakterienstammes wurden 5 ml TYM-Medium angeimpft und bei 37°C über Nacht im Schüttler inkubiert. 100 ml vorgewärmtes TYM-Medium wurden mit 1 ml der Übernachtskultur beimpft, bis zu einer OD₅₉₅ von 0,5 angezogen und dann 15 min auf Eis gekühlt. Die Bakteriensuspension wurde auf zwei vorgekühlte 50 ml Reaktionsgefäße verteilt und für 15 min bei 3.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml eiskaltem Tfb I resuspendiert und wiederum 10 min bei 3.000 rpm und 4°C pelletiert. Danach wurden die Bakterien vorsichtig in 20 ml eiskaltem Tfb II resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min bei 3.000 rpm und 4°C) wurde das Pellet wieder in 5 ml Tfb II aufgenommen und nach Zugabe von 10 % Glycerin in Aliquots von je 200 µl verteilt. Die Zellen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die auf diese Weise hergestellten kompetenten Bakterien konnten für mehrere Monate bei -80°C gelagert werden.

TYM-Medium	Trypton	20 g/l
	Hefeextrakt	20 g/l
	NaCl	100 mM
	MgSO ₄	10 mM
Tfb I	MOPS, pH 7.0	10 mM
	RbCl ₂	10 mM
Tfb II	MOPS, pH 6.5	10 mM
	CaCl ₂	50 mM
	RbCl ₂	10 mM

Zur Transformation wurde zunächst der Ligierungsansatz bzw. die Plasmid-Lösung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammen mit 2 µl einer 1:10-Verdünnung von β-Mercaptoethanol in H₂O_{bid} vorgelegt und vorsichtig mit 100 µl der auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterien vermischt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 45 sec bei 42°C. Daraufhin wurden die Bakterien 5 min auf Eis abgekühlt und danach mit 1 ml NZCYM- oder SOC-Medium versetzt. Die Bakterien wurden dann 1 h bei 37°C im Wasserbad regeneriert, kurz abzentrifugiert und in ca. 50 µl Überstand resuspendiert. Anschließend wurden der komplette Ansatz auf LB-Agarplatten mit geeigneten Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

NZCYM	NZ Amin	10 g/l
	NaCl	5 g/l
	Hefeextrakt	2 g/l
	MgSO ₄ x 6 H ₂ O	2 g/l
	Casaminosäuren pH 7.5	1 g/l

SOC-Medium	Trypton	20 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCL ₂	10 mM
	MgSO ₄	10 mM
	Glukose	20 mM

3.1.3 TRANSFORMATION VON *E. COLI* DURCH ELEKTROPORATION

Die Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach Sharma und Schirmke (Sharma und Schimke, 1996). 1 l YENB-Medium wurde mit 10 ml einer frischen Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₅₉₅ von 0,5–0,9 bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden 5 min auf Eis gekühlt und anschließend 10 min bei 6.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde daraufhin durch Resuspension zweimal mit 100 ml eiskaltem H₂O_{bid} und einmal mit 20 ml 10 % Glycerin gewaschen, in einem Endvolumen von 3 ml 10 % Glycerin aufgenommen, in Aliquots von je 50 µl verteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

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

Für die Elektroporation von Ligationsansätzen mußte dieser zur Entsalzung zunächst gefällt werden. Hierfür wurden zum Ansatz 5 µg Lachssperma DNA als *Carrier*, ¹/₁₀ Vol. 3 M NaOAc und 1 Vol. Isopropanol gegeben. Nach 10 min Zentrifugation bei Raumtemperatur wurde das Pellet mit EtOH_{75%} gewaschen, getrocknet und in 10 µl H₂O_{bid} aufgenommen. Die elektrokompenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl der Zellsuspension mit 1–10 µl Plasmid-DNA vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 1 mm überführt. Die Elektroporation erfolgte in einem *Gene Pulser* (BIORAD) nach den Anweisungen des Herstellers bei einer Spannung von 1,25 kV, einer Kapazität von 25 µF, sowie einem Parallelwiderstand von 200 Ω. Dabei wurde eine Zeitkonstante von ca. 5 ms erreicht. Nach dem Puls wurden die Zellen sofort mit 1 ml SOC-

Medium aus den Küvetten gespült, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 1 h bei 37°C bebrütet. Dann wurden sie abzentrifugiert, in ca. 50 µl Überstand resuspendiert und auf LB-Nährböden mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

3.2 GEWEBEKULTUR

3.2.1 VERMEHRUNG UND AUFBEWAHRUNG VON ZELLEN

3.2.1.1 Kultivierung von Säugerzellen als Einschichtkultur

Adhärente Zellen wurden als Einschichtkulturen in liegenden Polystyrolflaschen kultiviert. Als Nährlösung diente *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (Dulbecco, 1959) mit 0,11 g/l Natriumpyruvat. Das Medium wurde mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) angereichert und mit 5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 U/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin in 0,9 % NaCl-Lösung) versetzt. Die Zellen wurden bei 37°C in einem CO₂-Inkubator (7 % CO₂) bebrütet und regelmäßig mit frischem Medium versorgt. Alle drei bis fünf Tage wurden die Zellen im Verhältnis 1:4 bis 1:6 subkultiviert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden mit sterilfiltriertem PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA-Lösung behandelt. Nach 2 bis 5 min Inkubation lösten sich die Zellen von der Unterlage ab und konnten in ein mit 1–2 ml fötalem Kälberserum gefülltes 15 oder 30 ml Reaktionsgefäß überführt werden, wo der Proteinüberschuß im Serum durch Konkurrenz die Proteaseaktivität des Trypsins gegen zelluläre Proteine stoppt. Nach Zentrifugation (3 min, 2.000 U/min, 4°C) wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen wurden in 5 ml DMEM resuspendiert. Anschließend wurden sie auf neue Kulturflaschen mit 37°C warmen Medium verteilt.

3.2.1.2 Gewinnung und Kultivierung primärer Rattennierenzellen

Unter semisterilen Bedingungen wurden von 5–6 Tage alten *Sprague Dawley*-Ratten (CHARLES RIVER, Kißlegg) die Nieren entnommen und in sterilem PBS bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Nieren wurden unter sterilen Bedingungen mit Pinzette und Skalpell oder einer Schere in einer Petrischale mit PBS mechanisch zerkleinert und anschließend in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit Kollagenase/Dispase (1 mg/ml PBS) überführt. Um eine vollständige enzymatische Aufspaltung zu gewährleisten, wurden 15 Nieren in 10 ml PBS bei 37°C für 3–4

h unter mehrmaligem Schütteln im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 2.000 rpm) von der PBS-Kollagenase/Dispase-Lösung abgetrennt und zweimal mit 20 ml PBS gewaschen. Abschließend wurden die Einzelzellen in DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin resuspendiert und auf 90 mm Gewebekulturschalen oder -flaschen verteilt. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen konnten weiter verwendet werden.

3.2.1.3 Lagerung von Säugerzellen

Für die Anlage von Dauerkulturen wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und nach Zentrifugation und Absaugen des Überstandes in fötalem Kälberserum mit 10 % DMSO resuspendiert. Sie wurden 24 h bei -20°C, weitere 24 h bei -80°C gelagert und schließlich in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Bei Bedarf wurde die Dauerkultur bei 37°C aufgetaut, in 5 ml Medium aufgenommen, abzentrifugiert um vorhandenes DMSO zu entfernen und mit frischem Medium in eine 75 cm² Kulturflasche überführt. Nachdem sich über Nacht lebende Zellen auf dem Flaschenboden abgesetzt hatten, wurde das vorhandene Medium durch Frisches ersetzt und die Zellen wurden wie unter 3.2.1.1 beschrieben weiter kultiviert.

3.2.2 BESTIMMUNG DER GESAMT-ZELLZAHL

Die Zelldichte wurde bei Bedarf mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer festgestellt. Hierzu wurden der Kultur etwa 100 µl Zellsuspension steril entnommen und diese $\frac{1}{10}$ bis $\frac{1}{100}$ verdünnt. Die Zellen aus 16 Kleinquadraten des kammereigenen Rasters wurden im Lichtmikroskop ausgezählt. Durch Multiplikation mit dem Faktor 10^4 und dem Verdünnungsfaktor erhält man die Zellzahl pro ml Gesamtkultur.

3.2.3 TRANSFEKTION VON SÄUGERZELLEN

Die Transfektion adhärenter Säugerzellen wurde nach der Calciumphosphat-Methode durchgeführt (Graham und Eb, 1973). Dazu wurden die Zellen in Petrischalen ausgesät und

12–24 h im Brutschrank inkubiert. Ungefähr 1 h vor Transfektionsbeginn wurde das Medium gewechselt. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Zellen eine Dichte von 40–60 %. Für je eine Petrischale wurden 5–10 µg DNA, 450 µl H₂O_{bid} und 50 µl 2,5 M CaCl₂ in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß angesetzt und anschließend tropfenweise unter leichtem Mischen (Vortex, Stufe 4) in ein mit 500 µl 2 x HeBS oder 500 µl 2 x BBS gefülltes Polystyren-Reaktionsröhrchen pipettiert. Die Lösung wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann wurde das entstandene Calciumphosphat/DNA-Kopräzipitat auf die Zellen getropft und durch leichtes Schwenken der Petrischale verteilt. Nach einer anschließenden Inkubation im Brutschrank für 12–16 h wurde das Medium gewechselt. Die Ernte der Zellen erfolgte nach weiteren 24–48 h.

2 x HeBS	HEPES	11,9 g/l
	NaCl	16,4 g/l
	Na ₂ HPO ₄	0,21 g/l
	(bzw. Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,26 g/l)
	pH 7.05 exakt	
2 x BBS	BES	50 mM
	NaCl	280 mM
	Na ₂ HPO ₄	1,5 mM
	pH 6.95 exakt	
2,5 M CaCl ₂	CaCl ₂	2,5 M

3.2.4 ETABLIERUNG VON ZELLINIEN AUS TRANSFORMIERTEN RATTENZELLEN

Adenovirale Gene der E1-Region wurden in primäre Rattennierenzellen (s. 3.2.1.2) mit der Calciumphosphat-Methode (s. 3.2.3) transfiziert. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen 1:3 subkultiviert und für weitere 3–4 Wochen im Brutschrank inkubiert. Nichttransfizierte, primäre Zellen starben während dieses Zeitraumes ab und wurden beim Wechseln des Mediums alle 3–4 Tage entfernt. Transfizierte Zellen, die die adenoviralen Genprodukte exprimierten, bildeten nach 2–3 Wochen transformierte Zellhaufen (*Foci*), die

mit Hilfe von Glasringen mit einem Durchmesser von 5 mm (NUNC) einzeln isoliert wurden. Dazu wurde die Unterseite der Glasringe mit Hilfe einer Pinzette in sterile Vaseline getaucht und auf diese Weise flüssigkeitsdicht auf die zu isolierenden *Foci* gesetzt, die vorher mit PBS gewaschen worden waren. In die Glasringe wurde dann 20 µl Trypsin-EDTA-Lösung pipettiert und nach einigen Minuten konnten die abgelösten Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt werden, in die 20 µl FKS vorgelegt worden war. Nach Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (5 min, 2.000 rpm, 4°C) wurden die Zellen in geeigneten Zellkulturschalen kultiviert und Zelllinien etabliert. Zur Selektion stabil transfizierter Zelllinien mit integrierten Resistenzmarkern wurden 24 h später zusätzlich 400 µg/ml G418 (Geneticin; GIBCO) zum Medium dazugegeben.

3.2.5 INFektion VON SÄUGERZELLEN MIT ADENOVIREN

Die Zellen wurden in Zellkulturpetrischalen mit 90 mm Durchmesser ausgesät und infiziert, sobald der Zellrasen zu 70–80 % konfluent gewachsen war (etwa 2×10^6 Zellen).

Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 5 µl H5wt300 (20 pfu/Zelle) in 2 ml PBS mit 20 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂ und 0,2 % FKS infiziert. Die Zellen wurden danach für eine Stunde bei 37°C inkubiert und alle 10 min leicht geschwenkt, um die Adsorption der Viren zu ermöglichen. Nach einer Stunde wurden die Viren abgesaugt, die Zellen mit 8 ml Medium bedeckt und im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Infektionsexperimente dieser Arbeit wurden von Julia Kzhyshkowska durchgeführt.

3.2.6 ERNTE UND AUFSCHLUß VON ZELLEN

3.2.6.1 Ernte von Säugerzellen

Die Zellen wurden geerntet, indem sie mit einem Plastikspatel von der Zellkulturschale gekratzt, in ein 15 ml Röhrchen pipettiert und bei 2.000 rpm 5 min abzentrifugiert wurden. Anschließend wurden sie mit 10 ml PBS gewaschen und wieder abzentrifugiert. Das erhaltene Zellsediment wurde entweder gleich weiterverwendet oder bei -80°C gelagert.

3.2.6.2 Aufschluß von Säugerzellen

Die bei -80°C gelagerten Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, das Zellsediment wurde dann in 100-500 μl RIPA-, RIPA-*light* oder NP-40-Puffer, der vorher mit der entsprechenden Menge an Protease-Inhibitoren (Cocktail Tabletten von ROCHE, Menge laut Anweisung) und (bei SUMOylierungs-Experimenten, s. Abb. 5) mit 10 mM Jodacetamid (SIGMA) vermischt worden war, resuspendiert und 1 h auf Eis gestellt. Das Lysat wurde 30 sec sonifiziert (BRAUN-Homogenisator, *output* -0,6; 0,5 Impulse/sec). Größere Zellbestandteile wurden anschließend bei 15.000 rpm 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde für weitere Experimente verwendet.

3.3 ADENOVIREN

3.3.1 TITERBESTIMMUNG VON VIRUSSTOCKS

Der Titer des Virusstocks wurde mit Hilfe eines *Plaque Assay* bestimmt (Jakoby und H., 1979). MCF7-Zellen wurden in einer Dichte von etwa 2×10^6 Zellen in Zellkulturpetrischalen mit Adenoviren in verschiedenen Verdünnungsstufen infiziert. Ausgegangen wurde von 50 μl des Virusstocks, der in 5 ml PBS, 20 mM Calcium, 20 mM Magnesium und 0,2 % FKS verdünnt wurde. Von den Verdünnungsstufen 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} und 10^{-12} wurde in Parallelansätzen jeweils 1 ml auf die Zellen verteilt. Um die Adsorption der Viren zu ermöglichen, wurden die Zellen für eine Stunde in den 37°C Brutschrank gestellt und alle 10 min leicht geschwenkt. Anschließend wurden die Viren abgesaugt und die Zellen mit 8 ml des 46°C warmen *Overlay*-Mediums (50 ml 2 x MEM *Overlay* Medium, 50 ml Zellkulturagar, flüssig; 3 ml FKS; 3 ml 7,5 % NaHCO_3 ; 0,1 % Penicillin/Streptomycin; 1 % Nystatin) bedeckt. Das Medium erstarrt bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach 5 Tagen wurde erneut 8 ml *Overlay*-Medium auf die Zellen gegeben, nach 10 Tagen 8 ml *Overlay*-Medium mit 0,002 % Neutralrot. Nach 12–14 Tagen wurden im Lichtmikroskop *Plaques* sichtbar, die ausgezählt werden konnten.

Infektionsexperimente dieser Arbeit wurden von Julia Kzhyshkowska durchgeführt.

3.3.2 ISOLIERUNG VON VIREN AUS DER ZELLKULTUR

Infizierte Zellen zeigten 3 Tage nach Infektion deutliche zytopathische Effekte. Das Medium färbte sich gelb und die Zellen lösten sich ab. Da 90 % der produzierten Viren zellassoziiert bleiben (Jakoby und Pastan, 1979), wurden die Zellen aus einer 125 cm² großen Zellkulturflasche 3 min bei 2.000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml 10 mM Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert und durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen lysiert. Das Lysat wurde bei 5.000 rpm 10 min abzentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde für weitere Infektionen verwendet. Infektionsexperimente dieser Arbeit wurden von Julia Kzhyshkowska durchgeführt.

3.4 PROTEIN

3.4.1 QUANTITATIVE PROTEINBESTIMMUNG IM BIORAD PROTEIN-ASSAY

Die Proteinkonzentration einer Probe wurde nach Bradford mit dem Protein-*Assay* der Firma BIORAD bestimmt (Bradford, 1976). Das Färbereagenz dieses Testsystems bindet an vorhandene Proteine und unterliegt dabei einer Farbveränderung, welche sich photometrisch in einer Absorptionszunahme bei 595 nm äußert. Aus dem Vergleich der gemessenen OD₅₉₅ mit den Werten einer Eichkurve läßt sich die Proteinkonzentration der Probe ermitteln.

Unterschiedliche Verdünnungen der zu bestimmenden Proteinprobe und 1 bis 20 µg des Eichproteins Lysozym wurden in Polystyrol-Küvetten mit PBS jeweils auf ein Gesamtvolumen von 800 µl aufgefüllt und, nach Zugabe von 200 µl Färbereagenz, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde photometrisch die Absorption bei 595 nm gegen den Nullwert (800 µl PBS + 200 µl Färbereagenz) bestimmt.

3.4.2 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine in Gegenwart eines hohen SDS-Überschusses elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dabei lagert

sich das negativ geladene SDS in konstanten Gewichtsverhältnissen an die Proteine an und kompensiert deren positive Ladung so, daß alle Proteine ihrer Größe entsprechend zur Anode wandern. Nach Lämmli werden die Proteine unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel konzentriert und wandern von dort gemeinsam in das Trenngel ein (Lämmli, 1970). Der Aufbau der Gelapparaturen und das Gießen der Gele erfolgte entsprechend der Angaben der Hersteller, zur unten aufgelisteten Zusammensetzung der Gellösungen siehe Harlow und Lane (Harlow und Lane, 1988). Als Molekulargewichtsstandard wurde der *Broad Range Marker* (BIORAD) verwendet. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit dem gleichen Volumen eines zweifach konzentrierten SDS-Probenpuffers versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 20 mA pro Gel in TGS-Puffer bis die Bromphenolblau-Bande gerade ausgelaufen war. Im Anschluß an die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese konnten die aufgetrennten Proteine über eine der nachfolgenden Techniken detektiert werden.

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

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

3.4.3 WESTERN BLOT

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden diese nach Auftrennung in Polyacrylamidgelen zunächst nach dem Western Blot-Verfahren auf Nitrozellulose-Membranen (Protran, SCHLEICHER & SCHUELL) übertragen. Der Transfer erfolgte mit Hilfe einer *SemiPhorTM Electroblotting*-Apparatur (HOEFER) nach Anleitung des Herstellers in *Towbin*-Puffer bei einer Stromstärke von 1 mA/cm² für 1 h. Auf der Membran immobilisierte Proteine wurden anschließend mit Ponceau S reversibel angefärbt und die Markerbanden mit Kugelschreiber markiert. Um freie Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde der Filter über Nacht bei 4°C in PBS mit 5 % (w/v) Magermilchpulver geschwenkt. Die anschließende Inkubation in einer Lösung des spezifischen Antikörpers (verschiedene Verdünnungen in PBS) erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Nach der Bindung des primären Antikörpers wurde die Membran 3 x 10 min in PBS-Tween gewaschen, für 1 h in einer geeigneten Verdünnung eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers geschüttelt und wiederum 3 x 10 min in PBS-Tween gewaschen. Für den spezifischen Proteinnachweis wurde das ECL-System (*Enhanced Chemoluminescence System*) von PIERCE (SuperSignal® West Pico Chemoluminescent Substrate) nach Vorschrift verwendet. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip der verstärkten Chemolumineszenz unter Beteiligung des Enzyms HRP und stellt ein nichtradioaktives Nachweisverfahren von hoher Sensitivität dar. In dem hier verwendeten System wird das zyclische Diacylhydrazid Luminol durch die an den anti-Immunglobulin-Antikörper gekoppelte Peroxidase unter alkalischen Bedingungen oxidiert, was zu einer Lichtemission mit einem Maximum bei 428 nm führt. Chemische Verstärker wie z.B. Phenol erhöhen die Lichtintensität um den Faktor 1.000 und verlängern den Zeitraum der Emission, so daß eine maximale Intensität 5–20 min nach Einsetzen der Reaktion und eine anschließende Abnahme der Strahlung mit einer Halbwertszeit von 1 h zu beobachten sind.

Die autoradiographische Detektion des Signals fand während Expositionszeiten zwischen 5 sec und 10 min mit einem Röntgenfilm (X-OMATTM AR, KODAK) statt.

<i>Towbin</i> -Puffer	Tris/HCl, pH 8,3	25 mM
	Glycin	200 mM
	SDS	0,05 % (w/v)
	Methanol	20 % (v/v)
Ponceau S	Ponceau S	0,2 % (w/v)
	Trichloressigsäure	3 % (w/v)
	Sulfosalicylsäure	3 % (w/v)
PBS-Tween	Tween-20 in PBS	0,1 % (v/v)
HRP-gekoppelte	Anti-Maus (AMERSHAM)	1:5.000
Sekundärantikörper	Anti-Ratte (SIGMA)	1:5.000
	in PBS	1:20.000

3.4.4 IMMUNPRÄZIPITATION

Die Immunpräzipitation ermöglicht die Aufreinigung von Proteinen bzw. Proteinkomplexen über spezifische, an eine Sepharose-Matrix gebundene Antikörper. Die Kopplung von Maus-Antikörpern erfolgte an Protein A-Sepharose (SIGMA). Dabei handelt es sich um Sepharose-Partikel, an die kovalent das Protein A aus *Staphylococcus aureus* gekoppelt ist. Dieses bakterielle Protein bindet an den Fc-Teil von Antikörpern. Für die Immunpräzipitation von Ratten-Antikörpern wurde Protein G-Sepharose (SIGMA) verwendet, eine Variation von Protein A. Aufgrund des hohen Molekulargewichts der Sepharose kann diese durch Zentrifugation abgetrennt und gebundene Proteine anschließend im Western Blot detektiert werden. Durch Koimmunpräzipitation ist es möglich, spezifische Bindungen von Proteinen an das vom Antikörper erkannte Protein nachzuweisen. Dabei ist die Stringenz des eingesetzten Lysepuffers von maßgeblicher Bedeutung (s. 2.5).

NP-40	→ niedrige Stringenz
RIPA- <i>light</i>	→ mittlere Stringenz
RIPA	→ hohe Stringenz

Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und das gewünschte Volumen einer Zellsuspension für 3 min bei 2.000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend einmal in PBS gewaschen und auf Eis in Lysepuffer aufgenommen. Diese wurde vor Gebrauch mit einem Protease Inhibitor-Cocktail (ROCHE) nach den Anweisungen des Herstellers und (bei SUMOylierungs-Experimenten, s. Abb. 5) mit 10 mM Jodacetamid (SIGMA) versetzt. Nach dem Zellaufschluß durch Ultraschall-Behandlung wurden unlösliche Zellfragmente für 5 min bei 15.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Ein Aliquot des Überstandes wurde sofort mit gleichem Volumen SDS-Probenpuffer versetzt und als *Input*-Fraktion bei -20°C gelagert. Der Rest wurde für die Immunpräzipitation eingesetzt. Für 10 Ansätze wurden 30 mg lyophilisierte Protein A-Sepharose in 1 ml PBS 1 h bei 4°C auf einem Tischschüttler äquilibriert. Die Suspension wurde abzentrifugiert (5 min, 6.000 rpm, 4°C), das Pellet in 1 ml PBS gewaschen und entweder in 1 ml Hybridomüberstand oder 1 ml PBS sowie 5–10 µl gereinigtem Antikörper (10–20 µg) aufgenommen. Die Bindung der Antikörper an die Matrix fand während einer dreistündigen Inkubation bei 4°C in einem Überkopfschüttler statt. Die Suspension wurde daraufhin erneut 5 min bei 6.000 rpm abzentrifugiert, die Sepharose in 1 ml Lysepuffer gewaschen und in 1 ml Lysepuffer aufgenommen. Für Koimmunpräzipitationen wurde die zu untersuchende Proteinlösung mit äquivalenter Menge vorinkubierter Protein A-Sepharose für 1 h auf einem Drehmotor bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungen zu eliminieren und anschließend wie oben abzentrifugiert. Pro Ansatz wurden 100 µl der Sepharose A-Antikörper-Suspension mit 100–500 µl Zellysat gemischt und über Nacht bei 4°C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Daraufhin wurde die Suspension wie beschrieben abzentrifugiert, dreimal mit je 1 ml Lysepuffer gewaschen und in 25–50 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen. Anschließend konnten die Proben im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und weiter analysiert werden.

3.4.5 IMMUNFLUORESCENZ

Sterile Deckgläser wurden in Zellkulturschalen mit 6 Vertiefungen (6-*well* Schale) gelegt, darauf die Zellen subkonfluent ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Fixierung der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Deckgläser zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 2 % Paraformaldehyd (PFA in PBS) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung des PFAs erfolgte die Permeabilisierung durch PBS mit 0,5 % Triton X-100. Nach einer Inkubationsdauer von 15 min bei RT wurden die Zellen schließlich mit 4 % PFA (in PBS) für 10 min fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. In PBS ist eine Lagerung der Zellen im Kühlschrank bei 4°C eine Woche möglich. Für die Immunfluoreszenz wurden die Deckgläser in Zellkulturschalen mit 12 Vertiefungen (12-*well*-Schale) überführt, kurz in PBS gewaschen und je Deckglas mit 10 ml *Blocking Reagent* (ROCHE) für eine halbe Stunde bei RT inkubiert. Nach Entfernen des Überstands und einem Waschschrift in PBS/0,1 % Tween-20 wurden pro Deckglas 10–15 µl Primärantikörper zugegeben und eine halbe Stunde inkubiert. Im Anschluß wurde 3 x 5 min in PBS gewaschen, bevor die Zellen mit Sekundärantikörper für eine halbe Stunde inkubiert wurden. Nichtgebundener zweiter Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Deckgläser konnten nun aus der 12-*well*-Schale genommen, vorsichtig getrocknet und mit den Zellen nach unten auf einen Objektträger gelegt werden, auf dem pro Deckglas 5 µl *Glow Mounting Medium* (ENERGENE) vorgelegt waren. Die weitere Analyse erfolgte mit Hilfe des institutseigenen Immunfluoreszenzmikroskops (LEICA) oder eines konfokalen Laserscanningmikroskops (LEICA) mit digitalem Bildverarbeitungssystem der Klinik für Neurologie am Bezirksklinikum Regensburg.

3.4.6 REPORTER-ASSAY

Zur Überprüfung der direkten und indirekten Repression der Transkription durch Ad5 E1B-55kDa (s. Ergebnisse) wurde das *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (PROMEGA) nach den Anweisungen des Herstellers verwendet. Dazu wurden H1299- oder BRK1-Zellen mit den jeweils angegebenen Plasmiden (s. Abb. 9, 18 und 19) transfiziert. Die Reporterplasmide pRE-Luc und pTK-Gal-Luc enthalten das Luziferase-Gen aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis*. Neben dem Substrat Luziferin benötigt dieses Enzym die Cofaktoren Mg^{2+} und ATP.

Gleichzeitig wurden die Zellen mit dem mitgelieferten Vektor pRL-null transfiziert. Das Plasmid enthält das Gen für Luziferase aus *Renilla reniformis* unter Kontrolle des konstitutiven Thymidin-Kinase Promotors. Dieses Enzym benötigt als Substrat für eine Lichtreaktion Coelenterazin und keine weiteren Kofaktoren. Um im System variierende Parameter, wie Zellzahl, Zellyse, Transfektionseffizienz etc. zu berücksichtigen, wird zum Zellysat zunächst das Substrat Luziferin zugegeben, die Aktivität der *Photinus*-Luziferase gemessen, anschließend dessen Aktivität durch Kofaktor-Inaktivierung (EDTA, ATPasen) gequencht und nach Zugabe des Substrats Coelenterazin, die konstitutive Aktivität der *Renilla*-Luziferase bestimmt. Der Quotient beider Werte repräsentiert dabei die relative Aktivität der *Photinus*-Luziferase, unabhängig von variierenden Versuchsparametern.

Für die Versuche wurden $\sim 10^5$ Zellen in 6-wells ausgesät und am nächsten Tag mit den angegebenen Mengen (s. Abb. 9, 18 und 19) an Reporter-Plasmid, *Renilla*-Plasmid sowie Effektor-Plasmiden mit der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Nach 48 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen, 150 µl PLB (*passive lysis buffer*) pro Ansatz auf die Zellen gegeben und 20 min bei RT belassen. Durch Pipettieren wurden die Zellen daraufhin vollständig abgelöst und suspendiert und durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff lysiert. Nach dem Auftauen wurden Zellfragmente für 30 sec bei 15.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand konnte bei Bedarf für 2 Wochen bei -20°C gelagert werden. In Luminometerröhrchen wurden 100 µl LAR II (*luciferase assay reagent II*) vorgelegt, 20 µl Zellysat zugegeben und durch mehrmaliges auf- und ab-pipettieren vermischt. Die Proben wurden daraufhin sofort mit einem Luminometer (BERTHOLD) in einem Zeitfenster von 10 sec vermessen und die Luziferase-Aktivität als RLU (*relative light units*) dokumentiert. Für die Messung der *Renilla*-Luziferase-Aktivität wurde der Probe unmittelbar danach 100 µl *Stop&Glo*-Lösung zugegeben und ebenfalls unter möglichst konstanten Bedingungen gemischt. Die Messung der RLU erfolgte wie beschrieben.

3.5 DNA

3.5.1 SYNTHESE UND REINIGUNG SYNTHETISCHER OLIGONUKLEOTIDE

Synthetische Oligonukleotide wurden hauptsächlich über die Firma METABION bezogen aber auch im Institut nach der Phosphoamidit-Methode mit einem Gerät der Firma MILLIPORE von Josef Köstler und Holger Melzl hergestellt. Nach Beendigung der Synthese erfolgte die Abspaltung von Schutzgruppen sowie die Elution von der Säulenmatrix während einer 4-stündigen Inkubation mit 1,5 ml 32 % Ammoniak bei 58°C in einem Schraubdeckel-Reaktionsgefäß. Überschüssiger Ammoniak wurde anschließend vorsichtig bei 58°C abgedampft und die Oligonukleotidlösung zur weiteren Reinigung auf eine mit 3 x 5 ml H₂O_{bid} äquilibrierte NAP10TM-Säule (PHARMACIA) aufgetragen. Die reine DNA konnte daraufhin mit 1,5 ml H₂O_{bid} eluiert und deren Konzentration in einer 1 cm Quarzküvette bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm photometrisch bestimmt werden. Für eine 1:100 Verdünnung wurde dabei folgende Faustformel herangezogen:

$$\text{Konz. (pmol/}\mu\text{l)} \approx \frac{\text{OD}_{260} \times 10.000}{\text{Länge}}$$

Die exakte Konzentration von Oligonukleotiden läßt sich wie folgt berechnen:

$$\text{Konz. (mol/l)} = \frac{\text{OD}_{260}}{\epsilon_{\text{oligo}} \times d}$$

Dabei ist d die Schichtdicke der Quarzküvette (hier 1 cm) und ϵ_{oligo} die Summe der molaren Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nukleotide, aus denen das Oligonukleotid zusammengesetzt ist. Hierfür gelten folgende Werte:

$$\begin{aligned}\epsilon_A &= 15200 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \\ \epsilon_C &= 9300 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \\ \epsilon_G &= 13700 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \\ \epsilon_T &= 9600 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}\end{aligned}$$

3.5.2 PRÄPARATION, REINIGUNG UND KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNA

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

Zur analytischen Isolierung kleiner Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde ein von Beck *et al.* (Beck *et al.*, 1993) modifiziertes Verfahren der alkalischen Lyse eingesetzt. Die so isolierte DNA konnte für Restriktions- und Sequenzanalysen eingesetzt werden. Hierzu wurden 1,5 ml Übernachtskultur 1 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen auf dem Schüttler in 200 µl Puffer S1 resuspendiert. Die Suspension wurde dann mit 400 µl Puffer S2 versetzt, vorsichtig geschwenkt, 5 min bei RT inkubiert, 300 µl Lösung S3 zugegeben, erneut 5 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 15.000 rpm zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde in 500 µl Isopropanol überführt und die DNA 10 min bei 15.000 rpm gefällt. Der Überstand wurde abgesaugt und das DNA-Präzipitat mit 1 ml EtOH_{abs} gewaschen, getrocknet und in 35 µl H₂O_{bid} gelöst.

Puffer S1	Tris/ HCl	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNase A	100 µg/ml
	Lagerung bei 4°C	
Puffer S2	NaOH	200 mM
	SDS	1 % (w/v)
Puffer S3	Ammoniumacetat	7,5 M
	Lagerung bei 4°C	

Die präparative Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA aus 100–2.000 ml Übernachtskultur erfolgte über die Anionenaustauscher-Säulen DX100 und DX500 (MACHEREY NAGEL) nach den Anweisungen des Herstellers.

3.5.2.2 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente (20 ng–10 µg) wurden sowohl für analytische, als auch für präparative Zwecke in 0,8–1,5 %igen Agarosegelen (w/v) elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Herstellung

solcher Gele wurde eine entsprechende Menge Agarose in einem Mikrowellenherd in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und zur späteren Färbung der DNA $1/20.000$ Vol. Ethidiumbromid-Stammlösung hinzugefügt. Die DNA-Proben wurden mit jeweils $1/10$ Vol. Auftragspuffer versetzt und bei einer Spannung von 5–10 V/cm aufgetrennt. Analytische Gele wurden auf einem UV-Durchlichtschirm (BACHOFER) bei einer Wellenlänge von 312 nm visualisiert und mit einem Geldokumentationssystem (MWG BIOTECH, Gel Print 2000) dokumentiert. Präparative Gele wurden zur Schonung der DNA bei langwelligem UV-Licht (365 nm) detektiert und entsprechende DNA-Banden ausgeschnitten.

50 x TAE	Tris	2 M
	NaOAc	0,25 M
	EDTA	50 mM
	Mit Eisessig pH 7,8	
Auftragspuffer	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Xylencyanol	0,25 % (w/v)
	Glycerin	50 % (v/v)
	50 x TAE	2 % (v/v)
Ethidiumbromid-Stammlösung	Ethidiumbromid	10 mg/ml
	Lagerung bei 4°C, lichtgeschützt	

3.5.2.3 Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte entweder mit *N Extrakt Spin Columns* (MACHEREY-NAGEL), mit dem *Qiagen Gel Extraction Kit* von QIAGEN (beide nach Anleitung des Herstellers) oder nach der Methode von Boyle und Lew. (Boyle und Lew, 1995) Diese Methoden beruht auf der elektrostatischen Bindung von in Lösung gebrachter DNA an suspendierte Glasmilchkügelchen. Zur praktischen Durchführung wurde dafür der *Geneclean-Gelextraktionskit* der Firma BIO101 verwendet. Dabei wurden im Anschluß an die Agarosegelelektrophorese die gewünschten DNA-Banden auf einem UV-Schirm aus dem Gel ausgeschnitten und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß nach den Angaben des Herstellers im 3-fachen Volumen NaI-Lösung aufgenommen. Der Agaroseblock wurde durch Inkubation des

Ansatzes im Wasserbad (5 min, 55°C) aufgeschmolzen, dann wurde Glasmilch (1 µl pro µg DNA) zugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 sec, 14.000 rpm) wurde das Glasmilchsediment 3 x mit je 1 ml NEW WASH-Lösung gewaschen und die DNA durch Zugabe von 20–40 µl H₂O_{bid} und Inkubation im Wasserbad (5 min, 55°C) von den Glaskügelchen eluiert. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (5 sec, 14.000 rpm), der DNA-haltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Glasmilch	Silica-Partikel, Ø = 0,5–10 µm	100 mg/ml
	NaI	3 M
	(Boyle und Lew, 1995)	
NaI-Lösung	NaI	6 M
Waschpuffer	NaCl	50 mM
	Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
	EDTA	2,5 mM
	EtOH _{abs}	50 % (v/v)

3.5.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dazu wurde die DNA-Lösung in eine Quarzglasküvette (1 cm Schichtdicke) gegeben und ein UV-Absorptionsspektrum über den Wellenlängenbereich von 230 bis 300 nm aufgenommen. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Absorption von 1,0 im Absorptionsmaximum bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml.

3.5.3 RESTRIKTIONSENZYM-SPALTUNG VON DNA

3.5.3.1 Analytische Spaltung zur Charakterisierung von Plasmiden

1 µg DNA, 2 µl des entsprechenden 10 x konzentrierten Puffers (SuRE/ cut Puffer A, B, H, L, M von ROCHE; Zusammensetzung s. Herstellerangaben), 10 U der geeigneten Restriktionsendonuklease (10 U/µl; ROCHE) *ad* 20 µl steriles H₂O_{bid} wurden für mindestens 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch analysiert (s. 3.5.2.2).

3.5.3.2 Präparative Spaltung für Klonierungen

In diesem Fall wurde für die Spaltung von Plasmiden bzw. PCR-Produkten folgender Standardansatz verwendet: 10–30 µg DNA, 10 µl 10 x konzentrierten Puffer, 50 U (Einfachspaltung) oder zweimal 50 U (Doppelspaltung) Enzym, *ad* 100 µl steriles H₂O_{bid}. Diese Ansätze wurden 2–5 h bei 37°C inkubiert. Nach Spaltung durch Restriktionsenzyme wurde die DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.5.2.2).

3.5.4 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*, Saiki *et al.*, 1988) wurde verwendet für:

- die präparative Amplifikation zu klonierender DNA-Fragmente (s. 3.5.4.1)
- die *in vitro* Punktmutagenese (s. 3.5.4.2)
- die Sequenzierung von Plasmid-DNA (s. 3.5.7)

3.5.4.1 Standard PCR-Ansatz

Für einen 50 µl Standard-Reaktionsansatz wurden ca. 10 ng Plasmid-DNA bzw. 100 ng genomische DNA eingesetzt, weiterhin je 100 pmol der entsprechenden Oligonukleotide, 8 µl dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP je 2 mM), 5 µl 10 x PCR-Puffer und 1 µl thermostabile Taq-DNA-Polymerase oder Pwo-DNA-Polymerase (5 U/µl; ROCHE). Dieser

Ansatz wurde in dünnwandigen 0,2 ml Reaktionsgefäßen in einem Thermocycler (*GeneAmpTM PCR System 9700*, PERKIN ELMER) nacheinander wie folgt inkubiert:

1 min bei	95°C	Aufschmelzen der DNA
1 min bei	55–70°C	Hybridisieren der Oligonukleotide an die Zielsequenz
1 min bei	72°C	Polymerisation

Dieser Zyklus wurde 30 mal durchlaufen, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation bei 72°C, um 3'-Enden nicht-vollendeter PCR-Produkte aufzufüllen. Die so amplifizierte DNA wurde auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht verifiziert. Passende DNA-Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und für die Klonierung bzw. Sequenzierung weiter gereinigt.

3.5.4.2 Einführen von Mutationen durch PCR

Die *in vitro* Punktmutagenese rekombinant klonierter DNA erfolgte mit Hilfe des *QuikChange® Site Directed Mutagenesis Kits* (STRATAGENE) nach den Anweisungen des Herstellers mit Hilfe komplementärer Oligonukleotide, welche die gewünschte Zielsequenz repräsentieren und das gesamte Plasmid inklusive der Modifikation im Rahmen einer PCR-Reaktion amplifizieren.

3.5.5 LIGATION

Zur Konstruktion eines rekombinanten Plasmids wurde entweder der *Rapid DNA Ligation Kit* von ROCHE, bei PCR-Inserts der *TOPO TA Cloning Kit* von INVITROGEN, oder folgender Standard-Ligationsansatz angewandt: Vektor- und Fremd-DNA wurden im molaren Verhältnis von 1:2 bis 1:5 eingesetzt. Um die Religierung des linearisierten Vektors zu verhindern, wurde die Vektor-DNA nach der Restriktionsenzymspaltung mit 1 µl alkalischer Phosphatase (SAP, *shrimp alkaline phosphatase*, ROCHE) für 30 min bei 37°C dephosphoryliert. Ein Ligations-Standardansatz enthielt neben der Fremd-DNA 100 ng Vektor-DNA, 2 µl des 10 x konzentrierten Ligasepuffers (ROCHE), 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl; ROCHE) und *ad* 20 µl H₂O_{bid}. Die Ligation, d.h. die kovalente Verknüpfung von Vektor- und Fremd-DNA über

Phosphodiesterbrücken, erfolgte über Nacht bei 14°C. Am Folgetag wurden 10 µl des Ligationsansatzes nach der RbCl₂-Methode oder durch Elektroporation in kompetente *E. coli* transformiert (s. 3.1.2 und 3.1.3).

3.5.6 IDENTIFIKATION REKOMBINANTER KLONE

Ausgehend von transformierten *E. coli*, die auf LB-Agarplatten mit geeigneten Antibiotika wuchsen, wurden Einzelkolonien in LB-Flüssigmedium überimpft und über Nacht angezogen (s. 3.1.1.2). Von diesen Klonen wurde Plasmid-DNA präpariert (s. 3.5.2.1), die DNA mit geeigneten Restriktionsendonukleasen gespalten (s. 3.5.3.1) und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (s. 3.5.2.2). Anschließend wurden die so identifizierten rekombinanten Klone durch DNA-Sequenzierung (s. 3.5.7) überprüft und als Glycerinkultur (s. 3.1.1.3) gelagert.

3.5.7 DNA-SEQUENZIERUNG

Für die Sequenzierung wurden 300 ng Plasmid DNA und 6 pmol eines entsprechenden Oligonukleotids mit H₂O_{bid} auf ein Endvolumen von 8 µl aufgefüllt und mit 9,5 µl des Reaktionsgemisches (*Prism Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit*, APPLIED BIOSYSTEMS) versetzt. Im Anschluß wurde eine Amplifikation mit 60 Zyklen (15 sec bei 96°C, 15 sec bei 55°C und 4 min bei 60°C) durchgeführt. Der Einsatz eines Sequenzierautomaten der Firma APPLIED BIOSYSTEMS ermöglicht eine rasche und einfache Charakterisierung von Nukleinsäuren, da die für die herkömmliche Sequenzierung mit der *T7-Polymerase* oder *Sequenase* erforderliche aufwendige DNA-Präparation durch eine PCR mit der thermostabilen Taq-Polymerase ersetzt wird. Die Bestimmung einer DNA-Sequenz wird dadurch ermöglicht, daß die Taq-Polymerase während der PCR-Reaktion auch fremde Substrate, die sogenannten *Dye-Terminatoren*, verwendet. Diese mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Desoxynukleosid-Triphosphate werden während der Reaktion neben den normalen Desoxynukleosid-Trophosphaten eingesetzt. Der Einbau dieser *Dye-Terminatoren* in den neusynthetisierten DNA-Strang resultiert, analog zu dem Verfahren der Didesoxy-

Sequenzierung (Sanger *et al.*, 1992) im Abbruch der DNA-Synthese. Allerdings befinden sich beim *Taq Cycle Sequencing* alle vier Terminatoren in einem Sequenzierungsansatz, welcher im folgenden nur eine Spur auf dem Sequenzgel beansprucht. Die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Terminatoren ermöglicht die Sequenzierung ohne Einsatz radioaktiver Substanzen.

Die Reaktionsprodukte wurden nach den Angaben des Herstellers gereinigt und in einem 7 %igen denaturierenden Polyacrylamid-Sequenziergel aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm SeqEdTM, Version 1.0.3 (APPLIED BIOSYSTEMS). Die DNA-Sequenzierungen dieser Arbeit wurden von Josef Köstler und Holger Melzl am Institut durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

4.1 SUMO-1-MODIFIKATION VON Ad5 E1B-55kDa

4.1.1 IDENTIFIZIERUNG EINER SUMO-1-KONSENSUSSEQUENZ IM E1B-55kDa-PROTEIN VON Ad5

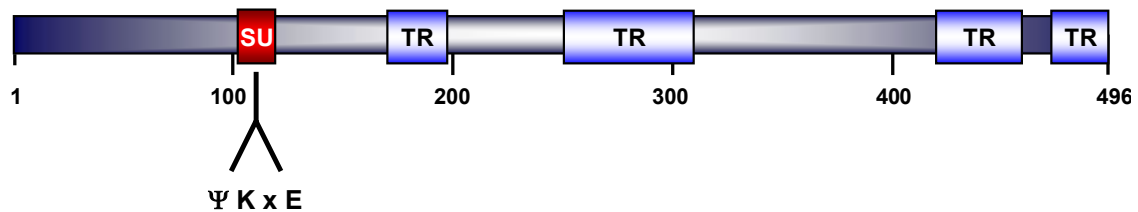
Zur Identifizierung weiterer transformationsrelevanter Domänen im Ad5 E1B-55kDa-Protein wurden mit Hilfe verschiedenster *Software*-Programme, wie z.B. dem BLAST-Server des BIOTECHNOLOGY INFORMATION CENTERS, Sequenzvergleiche mit der Proteindatenbank durchgeführt. Die Homologiesuche nach anderen bekannten Motiven zeigte, daß die Region an Position 103 bis 106 von E1B-55kDa starke Ähnlichkeit zu der SUMO-1-Konsensussequenz besitzt (s. 1.3.1). Überdies weisen auch andere Serotypen wie Ad2, Ad7 oder Ad9 dieses Sequenzmotiv auf, während die Vertreter der Subgruppe F (Ad40, 41) oder der hochonkogenen Subgruppe A (Ad12) keine vollständige Übereinstimmung mit der Konsensussequenz zeigen (Abb. 4). In beiden Fällen ist zwar das **K x E**-Motiv enthalten (im Fall von Ad12 E1B-54kDa sogar zweimal), es fehlt aber eine aliphatische Aminosäure (Ψ), die anscheinend für die SUMO-1-Modifikation notwendig ist (Rodriguez *et al.*, 2001).

Die starke Homologie der entsprechenden Sequenz im Ad5 E1B-55kDa-Protein zu Akzeptorregionen bereits charakterisierter zellulärer SUMO-1-Substratproteinen (Tab. 3) war Grund für die nähere Untersuchung dieses Motivs.

4.1.2 Ad5 E1B-55kDa WIRD *IN VIVO* AN POSITION 104 DURCH SUMO-1 MODIFIZIERT

Zur Untersuchung, ob die SUMO-1-Konsensussequenz von Ad5 E1B-55kDa tatsächlich als Akzeptorregion für die SUMO-1-Modifikation *in vivo* fungiert, wurden zwei Punktmutanten mittels PCR-Mutagenese hergestellt. In der ersten Mutante (pE1B-K104R) wurde *in vitro* das Lysin an Position 104 (K) durch ein Arginin (R) ersetzt. In der zweiten (pE1B-V103D) wurde die aliphatische Aminosäure Valin an Position 103 (V) durch die polare (saure) Aminosäure Aspartat (D) ersetzt.

A



B

RanGAP1	K526	G	L	L	K	S	E	D	K	V
PML	K160	W	F	L	K	H	E	A	R	P
	K490	K	V	I	K	M	E	S	E	E
Sp100	K297	V	D	I	K	K	E	K	P	F
p53	K386	L	M	F	K	T	E	G	P	D
CMV IE2	K175	P	L	I	K	Q	E	D	I	K
	K180	E	I	D	K	P	E	P	D	F
Ad5 E1B-55K	K104	K	G	V	K	R	E	R	G	A
Konsensus				Ψ	K	x	E			

C

Ad5	104	G	L	K	G	V	K	R	E	R	G	A	C	E
Ad2	103	G	L	K	G	V	K	R	E	R	G	A	S	E
Ad7	101	Q	N	R	G	I	K	R	E	R	N	P	S	G
Ad9	103	M	A	R	G	V	K	R	E	R	S	D	G	G
Ad40	92	R	G	T	K	R	K	M	E	N	E	G	E	D
Ad41	88	R	G	E	K	R	K	L	E	N	D	G	A	D
Ad12	88	A	D	D	R	D	K	Q	E	K	K	E	S	L

Abb. 4: Identifizierung einer SUMO-1-Konsensussequenz im E1B-55kDa-Protein von Ad5.

(A) Schematische Darstellung von Ad5 E1B-55kDa. Bereits identifizierte Domänen, die für die Transformation (TR) von Nagetierzellen in Kooperation mit E1A notwendig sind, wurden besonders gekennzeichnet (s. auch Abb. 2). Die Nummern beziehen sich auf die Aminosäureposition, wobei 496 die letzte AS darstellt. SU repräsentiert die neu identifizierte SUMO-1-Konsensussequenz an AS-Position 103–106. (B) Sequenzvergleich der SUMO-1-Akzeptorregionen verschiedener zellulärer Proteine mit Ad5 E1B-55kDa. Der Sequenzvergleich wurde aus einer Abbildung von Melchior *et al.*, 2000 (Melchior, 2000) entnommen. ψ steht für eine aliphatische, x für eine beliebige AS (C) Sequenzvergleich potentieller SUMO-1-Akzeptorregionen der großen E1B-Proteine verschiedener adenoviraler Serotypen. Die Nummern bezeichnen die Position des Lysinrestes innerhalb der SUMO-1-Konsensussequenz.

Im Anschluß wurden H1299-Zellen mit pE1B-WT, oder den Mutanten pE1B-K104R oder pE1B-V103D zusammen mit einem Plasmid, das für SUMO-1 (pSUMO-1) oder Epitop-markiertes SUMO-1 (pHA-SUMO-1) kodiert, transfiziert.

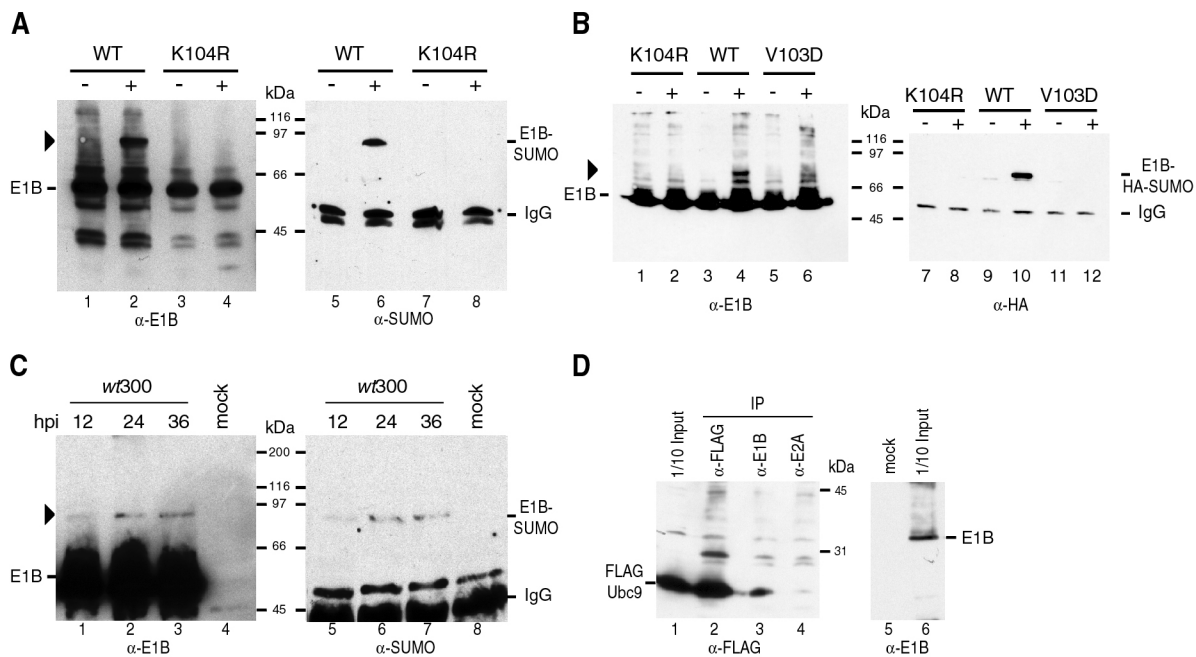


Abb. 5: Ad5 E1B-55kDa wird *in vivo* durch SUMO-1 kovalent modifiziert.

(A) Subkonfluente H1299 wurden mit pE1B-WT (Spur 1, 2, 5 und 6) oder pE1B-K104R (Spur 3, 4, 7 und 8) zusammen mit pSUMO-1 (Spur 2, 4, 6 und 8) transfiziert (Spur 1, 3, 5 und 7). Das E1B-55kDa-Protein (E1B) und eine höhere Bande des WT-Proteins (Pfeil) konnte durch Western Blot-Analyse des Gesamtzellextrakts mit einem anti-E1B-55kDa-Antikörper mAb 2A6 (links: α -E1B) oder durch Immunpräzipitation des Extrakts mit 2A6 gefolgt von Western Blot-Analyse mit einem anti-SUMO-1-Antikörper mAb 21C7 (rechts: α -SUMO) detektiert werden (Spur 2 und 6). (B) Analog dazu wurde die 75kDa-Bande von E1B-55kDa (Pfeil) im Gesamtzellextrakt von H1299-Zellen detektiert, die mit pHA-SUMO-1, zusammen mit pE1B-WT (Spur 3, 4, 9 und 10), pE1B-K104R (Spur 1, 2, 7 und 8) oder pE1B-V103D (Spur 5, 6, 11 und 12) transfiziert wurden. Western Blot-Analyse (links: α -E1B) oder Immunpräzipitation mit 2A6 gefolgt von Western Blot-Analyse mit einem anti-Epitop (HA)-Antikörper mAb 12CA5 (rechts: α -HA) zeigte, daß nur im Fall des WT-Proteins eine höhere Isoform-Bande des viralen Proteins, die dem HA-SUMO-1-modifizierten E1B-55kDa-Protein entspricht, auftrat (Spur 4 und 10). (C) Kovalente Modifikation von E1B-55kDa durch SUMO-1 in Ad-infizierten Zellen. MCF7-Zellen wurden mit wt300-Viren infiziert, und an angegebenen Zeitpunkten geerntet (hpi: *hours post infectionem*). Die Gesamtzellextrakte wurden anschließend mit dem 2A6-Antikörper immunpräzipitiert und entsprechende Banden mit mAb 2A6 (links: α -E1B) oder mAb 21C7 (rechts: α -SUMO) bei der Western Blot-Analyse sichtbar gemacht. E1B-WT und die SUMO-1-modifizierte Isoformbande sind entsprechend gekennzeichnet (Pfeil). (D) Interaktion von E1B-55kDa mit der SUMO-1-Konjugase Ubc9. H1299-Zellen wurden mit pE1B-WT und mit pFlag-Ubc9, das für ein Epitop-markiertes Ubc9-Fusionsprotein kodiert, transfiziert. Durch Koimmunpräzipitation des Gesamtzellextrakts mit dem mAb 2A6 (Spur 3) und zur Kontrolle mit dem anti-Flag Antikörper M2 (Spur 2) konnte bei der anschließenden Western Blot-Analyse mit dem anti-Flag Antikörper (α -Flag) das Epitop-markierte Ubc9 in beiden Fällen sichtbar gemacht werden. Die Verwendung eines unspezifischen Antikörpers (α -E2A, Spur 4) in der Immunpräzipitation führte nicht zum selben Ergebnis. Zusätzlich wurde die Expression der verwendeten Plasmide im Gesamtzellextrakt kontrolliert (Spur 1 und 6).

Mittels Western Blot-Analyse oder Immunpräzipitation gefolgt von Western Blot-Analyse konnte im Fall des E1B-WT-Proteins durch die Transfektion von pSUMO-1 oder pHA-SUMO-1 eine hochmolekulare Bande von ungefähr 75 kDa mit den entsprechenden Antikörpern sichtbar gemacht werden (Abb. 5A: Spuren 2 und 6/Abb. 5B: Spuren 4 und 10). Die E1B-Isoformbande, die der (HA-) SUMO-1-modifizierten Form von E1B-55kDa

entspricht, konnte im Fall der beiden Punktmutanten nicht detektiert werden (Abb. 5A: Spuren 4 und 8/Abb. 5B: Spuren 2, 6, 8 und 12). Diese Ergebnisse demonstrieren, daß Ad5 E1B-55kDa *in vivo* durch SUMO-1 (HA-SUMO-1) am Lysinrest an Position 104 modifiziert wird, und daß für die Konjugation ebenso die aliphatische Aminosäure (Valin) notwendig ist.

Als nächstes wurde die SUMOylierung des viralen Proteins im Kontext der adenoviralen Infektion untersucht (Abb. 5C). Dazu wurden die WT-infizierten Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und mit einem anti-E1B-Antikörper immunpräzipitiert. Bei der anschließenden Western Blot-Analyse mit anti-SUMO- oder anti-E1B-Antikörpern konnte bewiesen werden, daß SUMO-1 Modifikation von Ad5 E1B-55kDa auch während der viralen Infektion stattfindet und die hochmolekulare E1B-Bande auch nach 36 hpi noch sichtbar ist (Abb. 5C: Spuren 1, 2, 3, 5, 6 und 7).

Ein weiterer Beweis für die SUMO-1-Konjugation ist die Wechselwirkung von E1B-55kDa mit der SUMO-1-Konjugase Ubc9 (Abb. 5D). Aufgrund der Interaktion beider Proteine konnte nach Transfektion von H1299-Zellen mit pE1B-WT und pFlag-Ubc9 mit mAb 2A6 das Epitop-markierte Ubc9-Fusionsprotein im Gesamtzellextrakt koimmunpräzipitiert werden und mit dem anti-Flag-Antikörper in der Western Blot-Analyse sichtbar gemacht werden (Abb. 5D: Spur 3). Die Verwendung eines unpezifischen Antikörpers in der Koimmunpräzipitation als Kontrolle hingegen blieb wie erwartet erfolglos (Abb. 5D: Spur 4).

Die SUMO-1-Modifikation von Ad5 E1B-55kDa findet also *in vivo* sowohl durch Überexpression als auch in infizierten Zellen statt. Dies wird durch die Interaktion des viralen Onkoproteins mit der SUMO-1-Konjugase Ubc9 bestätigt.

4.1.3 SUMO-2- UND SUMO-3-MODIFIKATION VON AD5 E1B-55KDA

Die Ähnlichkeit von SUMO-1 zu zwei weiteren Ubiquitin-ähnlichen Proteinen, SUMO-2 und SUMO-3, die zu 97 % untereinander identisch sind und etwa eine 50 %ige Homologie zu SUMO-1 aufweisen, machte es wahrscheinlich, daß auch sie *in vivo* an die SUMO-1-Akzeptorsequenz von E1B-55kDa konjugiert werden. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurden H1299-Zellen mit pE1B-WT oder pE1B-K104R zusammen mit einem der SUMO-Konstrukte, pHA-SUMO-1, pHA-SUMO-2 oder pHA-SUMO-3, transfiziert.

Die Gesamtzellextrakte wurden dann entweder direkt auf ein 12 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen (Abb. 6A) oder mit mAb 2A6 immunpräzipitiert (Abb. 6B).

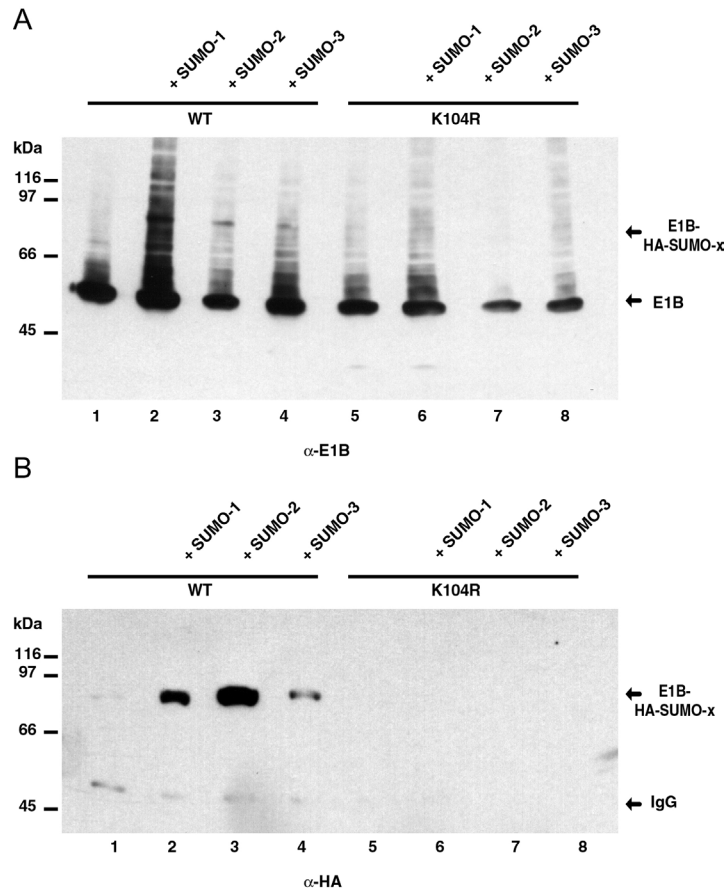


Abb. 6: SUMO-2- und SUMO-3-Modifikation von Ad5 E1B-55kDa.

Subkonfluente H1299-Zellen wurden mit pE1B-WT (Spuren 1-4) oder pE1B-K104R (Spuren 5-8) zusammen mit pHA-SUMO-1 (Spur 2 und 6), pHA-SUMO-2 (Spur 3 und 7), pHA-SUMO-3 (Spur 4 und 8) oder ohne (Spur 1 und 5) transfiziert. **(A)** Die hochmolekularen Banden des E1B-55kDa-WT-Proteins (Pfeil) bei etwa 75 kDa konnte durch Western Blot-Analyse des Gesamtzellextrakts mit mAb 2A6 (α-E1B) oder **(B)** durch Immunpräzipitation des Extrakts mit mAb 2A6 gefolgt von Western Blot-Analyse mit mAb 12CA5 (α-HA) detektiert werden (Spur 2 und 6). In beiden Abbildungen (A und B) entsprechen die Isoform-Banden der Spuren 2 SUMO-1-modifiziertem E1B-55kDa, der Spuren 3: SUMO-2-modifiziertem E1B-55kDa und Spuren 4 SUMO-3-modifiziertem E1B-55kDa.

Tatsächlich konnte in beiden Fällen durch Western Blot-Analyse mit mAb 2A6 (Abb. 6A) oder mAb 12CA5 (Abb. 6B) hochmolekulare Banden bei etwa 75 kDa detektiert werden, die der SUMO-1 (Abb. 6A: Spur 2/Abb. 6B, Spur 2), SUMO-2 (Abb. 6A: Spur 3/Abb. 6B: Spur 3) oder SUMO-3-modifizierten Isoform des E1B-55kDa-Proteins (Abb. 6A: Spur 4/Abb. 6B: Spur 4) entsprechen. Durch Überexpression der beiden nah verwandten SUMO-Proteine in Zellen konnte somit gezeigt werden, daß die SUMO-1-Akzeptorsequenz im Ad5 E1B-55kDa-Protein, bzw. das Lysin an Position 104 auch durch SUMO-2 oder SUMO-3 modifiziert werden kann. Hierbei bleibt offen, welches der drei Ubiquitin-ähnlichen Protein präferentiell an das virale Protein angeheftet wird, obwohl bei der Western Blot-Analyse des

Gesamtzellextrakts die SUMO-1-modifizierte E1B-Bande im Vergleich zu den anderen dominant zu sein scheint (Abb. 6A: Spur 2).

4.2 DIE ROLLE DER SUMO-1-MODIFIKATION BEI DER E1A/E1B-55kDa-VERMITTELTEN TRANSFORMATION

4.2.1 VERLUST DER TRANSFORMIERENDEN EIGENSCHAFTEN VON Ad5 E1B-55kDa DURCH MUTATION DER SUMO-1-AKZEPTORSEQUENZ

Zur Analyse der biologischen Funktion der SUMO-1-Konjugation von Ad5 E1B-55kDa bei der E1A-gekoppelten Transformation von Nagetierzellen wurde als nächstes die *Focus*-Bildung SUMO-defizienter E1B-Mutanten untersucht. Hierzu wurden primäre BRK-Zellen mit 4 µg pE1A und unterschiedlichen Mengen pE1B-WT, pE1B-K104R oder pE1B-V103D transfiziert (Abb. 7A). Zur Kontrolle wurden außerdem 4 µg pE1A alleine oder jeweils 4 µg pE1A und pE1B-R443 zusammen transfiziert. Von der Linker-Insertionsmutante E1B-R443 ist bekannt, daß sie zwar mit p53 interagieren kann, aber der fast vollständige Verlust ihrer transformierenden Eigenschaften mit dem Verlust ihrer repressorischen Aktivität bezüglich der Transaktivierung von p53 korreliert (s. 1.2.3.3; Yew und Berk, 1992).

Wie erwartet war die prozentuale *focus*-bildende Aktivität durch Kotransfektion von pE1A und pE1B-WT fast 8 mal höher als durch alleinige Transfektion von pE1A (Abb 7A).

Interessanterweise waren die SUMO-1-defizienten Mutanten E1B-K104R und E1B-V103D genauso wie die Kontrolle E1B-R443 vollkommen inaktiv in der kooperativen *Focus*-Bildung. Selbst die Transfektion der doppelten Plasmidmenge (8 µg) der beiden Mutanten konnte die *focus*-bildende Aktivität nicht wieder herstellen.

Dieses Experiment demonstriert, daß der Verlust der SUMO-1-Modifikation von Ad5 E1B-55kDa ähnlich wie der Verlust der repressorischen Eigenschaften des Proteins einen drastischen Effekt auf die E1A-gekoppelte Transformation von Nagetierzellen hat.

Aus den transformierten Zellhaufen (*Foci*) wurden, wie in Kap. 3.2.4 beschrieben, Zelllinien etabliert.

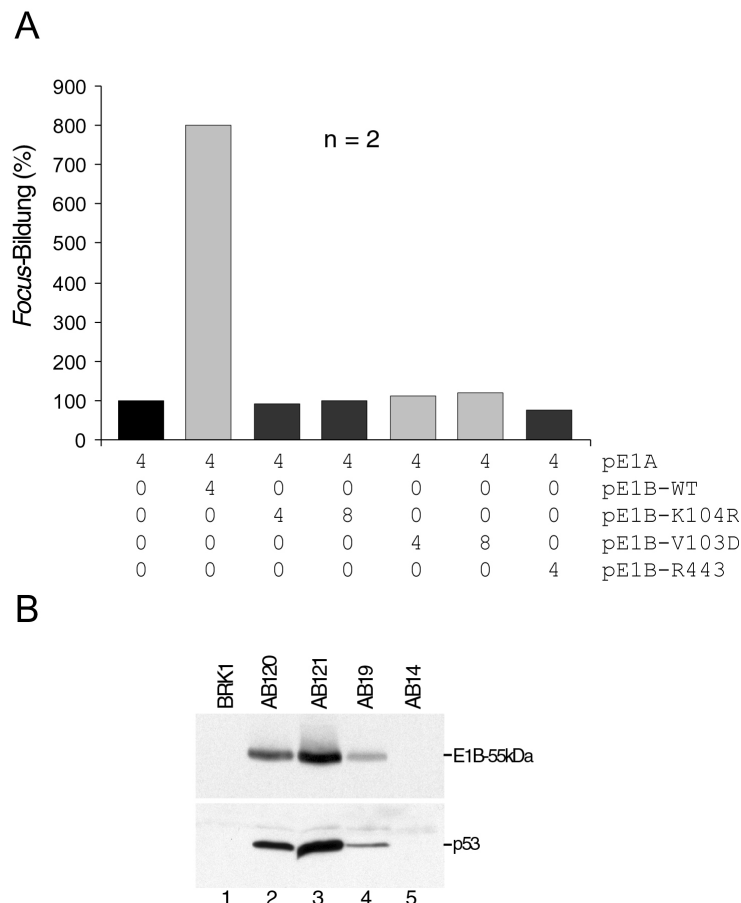


Abb. 7: Focus-Bildung durch Ad5 E1A, E1B-WT, E1B-K104R, E1B-V103D und E1B-R443. (A) Primäre BRK-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmidmengen transfiziert (μg DNA auf 3×10^6 Zellen). Die *focus*-bildende Aktivität der exprimierten Proteine verhält sich prozentual zu der Anzahl an *Foci*, die durch E1A alleine induziert wurden (100 %). Die durchschnittliche Anzahl an *Foci* für E1A alleine war 3 in zwei unabhängigen Experimenten. (B) Aus den *Foci* der transformierten Zellen wurden mit G418-Selektion polyklonale Zelllinien etabliert und nach Auftragen der Gesamtzellextrakte auf ein 12 %iges Polyacrylamidgel durch Western Blot-Analyse mit entsprechenden Antikörpern (oben: mAb 2A6, unten: mAb421) auf die Expression von E1B-55kDa und p53 untersucht. Die Zelllinien werden in Tab. 6 näher erläutert. Als Kontrolle diente die spontan immortalisierte BRK1-Zelllinie (Spur 1).

Zur Untersuchung der Expression der transfizierten E1B-Konstrukte und des Tumorsuppressorproteins p53 in den Zelllinien wurden äquivalente Mengen der Gesamtzellextrakte auf ein 12 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach SDS-PAGE und Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran konnten die Proteine durch Verwendung entsprechender Antikörper sichtbar gemacht werden (Abb. 7B).

E1B-WT-exprimierende Zelllinien (AB120 und AB121) zeigten eine stabile Expression des viralen wie auch des zellulären Proteins (Abb. 7B: Spur 2 und 3). Ebenso verhielt es sich auch im Falle der AB19-Zelllinie, die aber im Vergleich zu den WT-Zelllinien geringere Mengen

beider Proteine exprimierte (Abb. 7B: Spur 4). Einzig die R443-Zelllinie (AB14) zeigte überhaupt keine Expression hinsichtlich beider Proteine (Abb. 7B: Spur 5).

4.2.2 K104R-MUTATION DER SUMO-1-AKZEPTORREGION VON Ad5 E1B-55kDa BEEINFLUSST NICHT DIE INTERAKTION MIT P53

Bisher hat man angenommen, daß das transformierende Potential des Ad5 E1B-55kDa-Proteins mit seiner Fähigkeit korreliert, das Tumorsuppressorprotein p53 zu binden und die transkriptionsaktivierenden Eigenschaften von p53 zu inhibieren (s. 1.2.3.3).

Um zuerst zu überprüfen, welchen Einfluß die SUMO-Mutation in der Akzeptorregion von Ad5 E1B-55kDa auf die Bindungsaktivität mit p53 hat, wurden H1299-Zellen mit 1,5 µg pC53-SN3 zusammen mit 3 µg pE1B-WT, pE1B-K104R oder als Kontrolle pE1B-R443 transfiziert. Der Gesamtzellextrakt wurde dann entweder zur Kontrolle der Expression der transfizierten Plasmid auf ein 10 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen oder vor dem Auftragen mit mAb421, mAb 2A6 oder mit einem unspezifischen Antikörper als Kontrolle immunpräzipitiert (Abb. 8). Nach der Western Blot-Analyse mit mAB421 (Abb. 8A) oder mAb 2A6 (Abb. 8B) konnte man zum einen sehen, daß die Gleichgewichtsmengen der exprimierten Proteine gleich waren (Abb. 8A: Spuren 1–4/Abb. 8B: Spuren 1–4), zum anderen wurde offensichtlich, daß sowohl mit dem E1B-WT-Protein (Abb. 8A: Spur 8), als auch mit beiden Mutanten, E1B-K104R (Abb. 8A: Spur 9) und E1B-R443 (Abb. 8A: Spur 10), das Tumorsuppressorprotein durch Verwendung des mAb 2A6 zu koimmunpräzipitieren war.

Die Punktmutation in der SUMO-1-Akzeptorsequenz an der Position 104 von Ad5 E1B-55kDa ist also kein Hindernis für die Bindung an das Tumorsuppressorprotein.

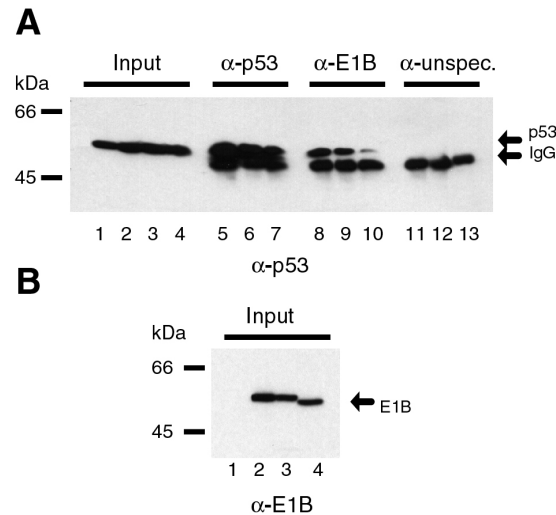


Abb. 8: Koimmunpräzipitation von p53 mit der Mutante E1B-K104R.

Subkonfluente H1299-Zellen wurden mit je 3 μ g pE1B-WT (A: Spuren 2, 5, 8 und 11/B: Spur 2), pE1B-K104R (A:Spuren 3, 6, 9 und 12/B: Spur 3) oder pE1B-R443 (A: Spuren 4, 7, 10 und 13/B: Spur 4) zusammen mit 1,5 μ g pC53-SN3 transfiziert. Zur Überprüfung der Expression der transfizierten Plasmide wurde der Gesamtzell-extrakt entweder direkt auf ein 10 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen (A: Spuren 1–4, Spur1: Extrakt von Zellen, die nur mit pC53-SN3 transfiziert wurden/B: Spuren 1–4, Spur 1: mock) oder erst mit mAb421 (α -p53), mAb 2A6 (α -E1B) oder einem unspezifischen Antikörper (α -unspec) immunpräzipitiert und dann aufgetragen. Die Western Blot-Analyse mit den Antikörpern mAb421 (α -p53, oben) und 2A6 (α -E1B, unten) zeigt, daß p53 sowohl mit E1B-WT (A: Spur 8), als auch mit E1B-K104R (A: Spur 9) oder E1B-R443 (A: Spur 10) kommunpräzipitierbar ist. Mit dem Kontrollantikörper konnte p53 hingegen nicht koimmunpräzipitiert werden (A: Spuren 11–13).

4.2.3 SUMO-1-KONJUGATION VON Ad5 E1B-55kDa IST NOTWENDIG FÜR DIE INHIBITION DER P53 TRANSAKTIVIERUNG

Da die SUMO-1-Modifikation von Ad5 E1B-55kDa scheinbar keine Funktion bei der Interaktion mit p53 hat, wurden als nächstes die inhibitorischen Eigenschaften der Mutanten E1B-K104R und E1B-V103D bezüglich der Transaktivierung des Tumorsuppressorproteins getestet. Die p53-negative Zelllinie H1299 wurde dafür mit den angegebenen Plasmidmengen des Reporterkonstrukts pRE-Luc, das fünf p53-Bindungsstellen vor dem Luziferasegen enthält, zusammen mit pC53-SN3 und pE1B-WT, pE1B-K104R, pE1B-V103D, pE1B-R443 oder einem leeren Vektor (pcDNA3) als Kontrolle kotransfiziert (Abb.9A). Durch zusätzliche Transfektion des pRL-null-Vektors war es möglich, die unterschiedlichen Expressionen der Reporter-Luziferase untereinander auf einen Standard abzugleichen (s. 3.4.6).

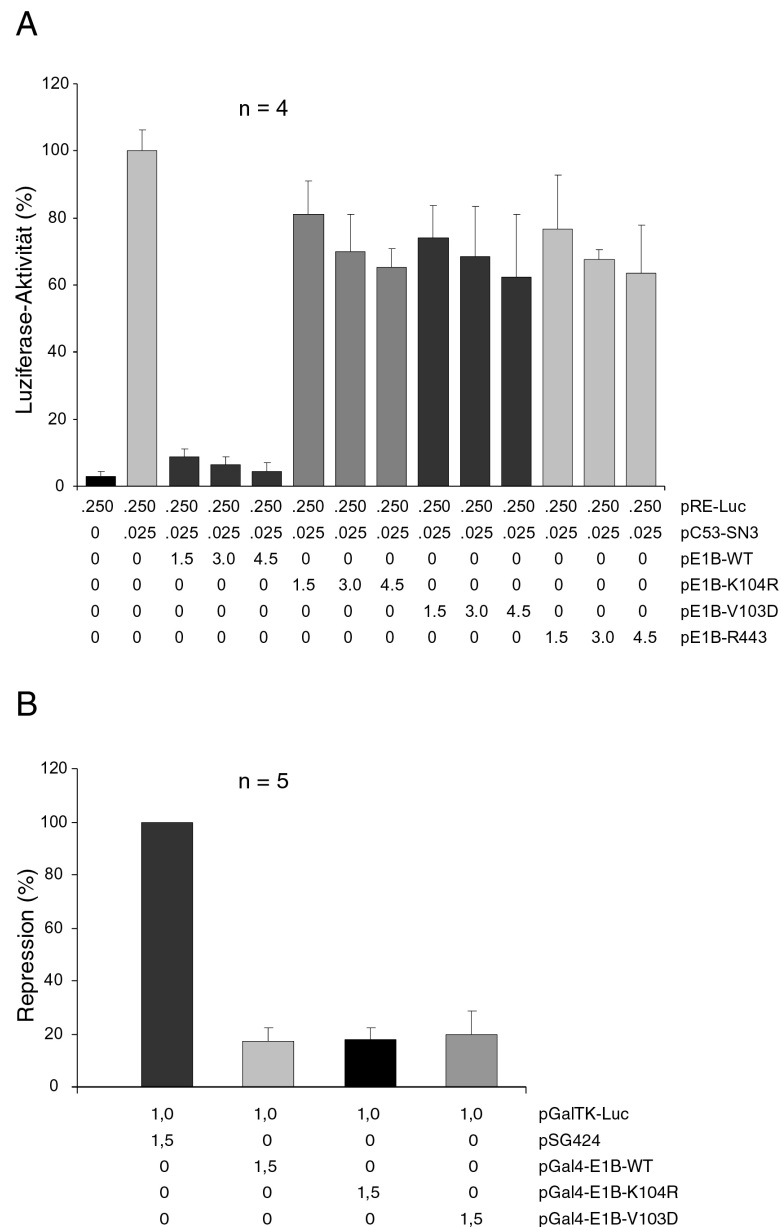


Abb. 9: Auswirkung der Punktmutationen K104R oder V103D im Ad5 E1B-55kDa-Protein auf seine repressorischen Eigenschaften. (A) Subkonfluente H1299-Zellen wurden mit den angegebenen Mengen des Reporterplasmids oder der Effektorplasmide (μg DNA) transfiziert. Die Standardabweichungen wurden aus vier unabhängigen und jeweils doppelt ausgeführten Experimenten ermittelt. (B) Zur Überprüfung der direkten Repression durch die beiden Mutanten E1B-K104R und E1B-V103D wurden subkonfluente BRK1-Zellen mit den angegebenen Plasmidmengen der Effektor und Reporterkonstrukte transfiziert. Die Standardabweichungen setzen sich aus fünf jeweils doppelt ausgeführten Experimenten zusammen. pSG424 kodiert für die Gal4-DNA-Bindungsdomäne unter der Kontrolle des frühen SV40-Promotors. Beschreibung der rekombinanten Plasmide: s. Tab. 8.

Wie erwartet war das Ad5 E1B-55kDa-Protein dazu in der Lage, die p53-abhängige Induktion des Reporterkonstrukts pRE-Luc etwa 10-fach zu reprimieren. Die Transfektion der doppelten (3,0 μg) und dreifachen (4,5 μg) Menge des viralen WT-Plasmids erhöhte die

Transkriptionsrepression sogar auf maximal das 20-fache. Interessanterweise aber führte die Transfektion der beiden pE1B-Mutanten, K104R und V103D, genauso wie der pE1B-R443-Mutante als Kontrolle zu einer Reduktion der Luziferaseexpression um 20 %. Selbst eine Steigerung der Plasmidmenge auf das Doppelte (3,0 µg) oder Dreifache (4,5 µg) konnte die p53-abhängige Expression des Reporterkonstrukts nur um maximal 40 % reduzieren. Die Punktmutationen in der SUMO-1-Akzeptorsequenz von Ad5 E1B-55kDa haben also einen direkten Einfluß auf die Repressoraktivität des viralen Proteins bezüglich der p53 Transaktivierung. Yew *et al.* konnten erstmals zeigen, daß das Onkoprotein auch eine p53-unabhängige direkte Repressoraktivität besitzt, sofern es zu den jeweiligen Promotoren transportiert wird (Yew *et al.*, 1994). Um auch die intrinsische Repression des viralen Proteins zu untersuchen, wurden Plasmide konstruiert, die für Fusionsproteine, zusammengesetzt aus der Gal4-DNA-Bindungsdomäne und E1B-WT bzw. den beiden SUMO-Mutanten E1B-K104R oder E1B-V103D, kodieren. Die Gal4-Domäne besitzt bekanntermaßen mehrere starke nukleäre Lokalisationssignale. Nach Kotransfektion des Reporterkonstrukts pGalTK-Luc, zusammen mit den angegebenen Plasmidmengen pSG424 oder den E1B-Konstrukten, zeigte sich, daß die intrinsische Repressoraktivität des adenoviralen Proteins nicht von den Punktmutationen in der SUMO-1-Akzeptorsequenz beeinflußt worden war (Abb. 9B). Beide Mutanten waren genauso wie das WT-Protein dazu in der Lage, die Transkription des Thymidinkinase-Promotors auf das 5-fache zu reprimieren (Abb. 9B).

Die K104R- und V103D-Mutationen beeinträchtigen also die Eigenschaft von Ad5 E1B-55kDa, die p53-abhängige Transkription zu inhibieren, haben aber keinen Einfluß auf die intrinsische Repressionsaktivität des viralen Proteins.

Die Ergebnisse zeigen, daß das fehlende transformierende Potential der Mutanten E1B-K104R und E1B-V103D mit den fehlenden inhibitorischen Eigenschaften bezüglich der p53-Transaktivierung korreliert. Dies läßt vermuten, daß Valin an Position 103 und Lysin an Position 104 nicht nur essentiell für die SUMO-Modifikation sind, sondern auch eine entscheidende Rolle bei der Inhibition der p53-abhängigen Transkription und der E1A-gekoppelten Transformation spielen.

4.3 EINFLUß DER SUMO-1-KONJUGATION AUF DIE SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON Ad5 E1B-55kDa

4.3.1 LOKALISATION VON Ad5 E1B-55kDa UND SUMO-1 IN TRANSFORMIERTEN RATTENZELLEN

Zahlreiche Untersuchungen zur Lokalisation von E1B-55kDa in Nagetierzellen oder menschlichen Zellen, die durch die E1-Region von Adenoviren der Subgruppe C (Ad2 oder Ad5) transformiert wurden, ergaben, daß sich das Onkoprotein hauptsächlich im Zytoplasma befindet, und dort zusammen mit p53 und WT1 im *Perinuclear Body* akkumuliert (s. 1.2.3.3). Voraussetzung für den E1B-vermittelten Export der beiden nukleären Tumorsuppressorproteine ist vermutlich die funktionelle Aktivität eines kürzlich identifizierten nukleären Exportsignals (Krätzer *et al.*, 2000; Maheswaran *et al.*, 1998). Andererseits gibt es auch zahlreiche Hinweise, daß SUMO-1 eine wichtige Rolle beim Protein-*Targeting*, also bei der Steuerung der subzellulären Lokalisation von Proteinen hat (s. 1.3.2). Aus diesem Grund wurde als nächstes der Einfluß der SUMO-1-Modifikation von Ad5 E1B-55kDa auf die subzelluläre Lokalisation durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen untersucht.

Hierzu wurden die etablierten Zelllinien AB120 und AB19, die stabil das E1B-WT-Protein (AB120) oder die E1B-K104R-Mutante (AB19) exprimieren, fixiert (s. 3.4.5) und mit entsprechenden Antikörpern inkubiert (Abb. 10).

Die *in situ* Untersuchungen ergaben, daß sowohl in AB120-Zellen (Abb. 10A a) als auch in AB19-Zellen (Abb. 10A d) das große E1B-Protein von Ad5 in einem zytoplasmatischen Proteinkomplex (*perinuclear body*) lokalisierte, während endogenes SUMO-1 in beiden Zelllinien eine diffuse Verteilung im Zellkern aufwies (Abb. 10A b und e).

Die subzelluläre Lokalisation von E1B-WT in AB120-Zellen aber änderte sich drastisch durch die zusätzliche Transfektion eines Plasmids, das für ein Epitop-markiertes (HA-)SUMO-1-Fusionsprotein kodiert (Abb. 10B). In diesen Zellen wurde das virale Protein in den Zellkern dirigiert, wo es zusammen mit HA-SUMO-1 in fadenförmigen (Abb. 10B a–c) oder punktförmigen Strukturen (Abb. 10B d–f) kolokalisierte.

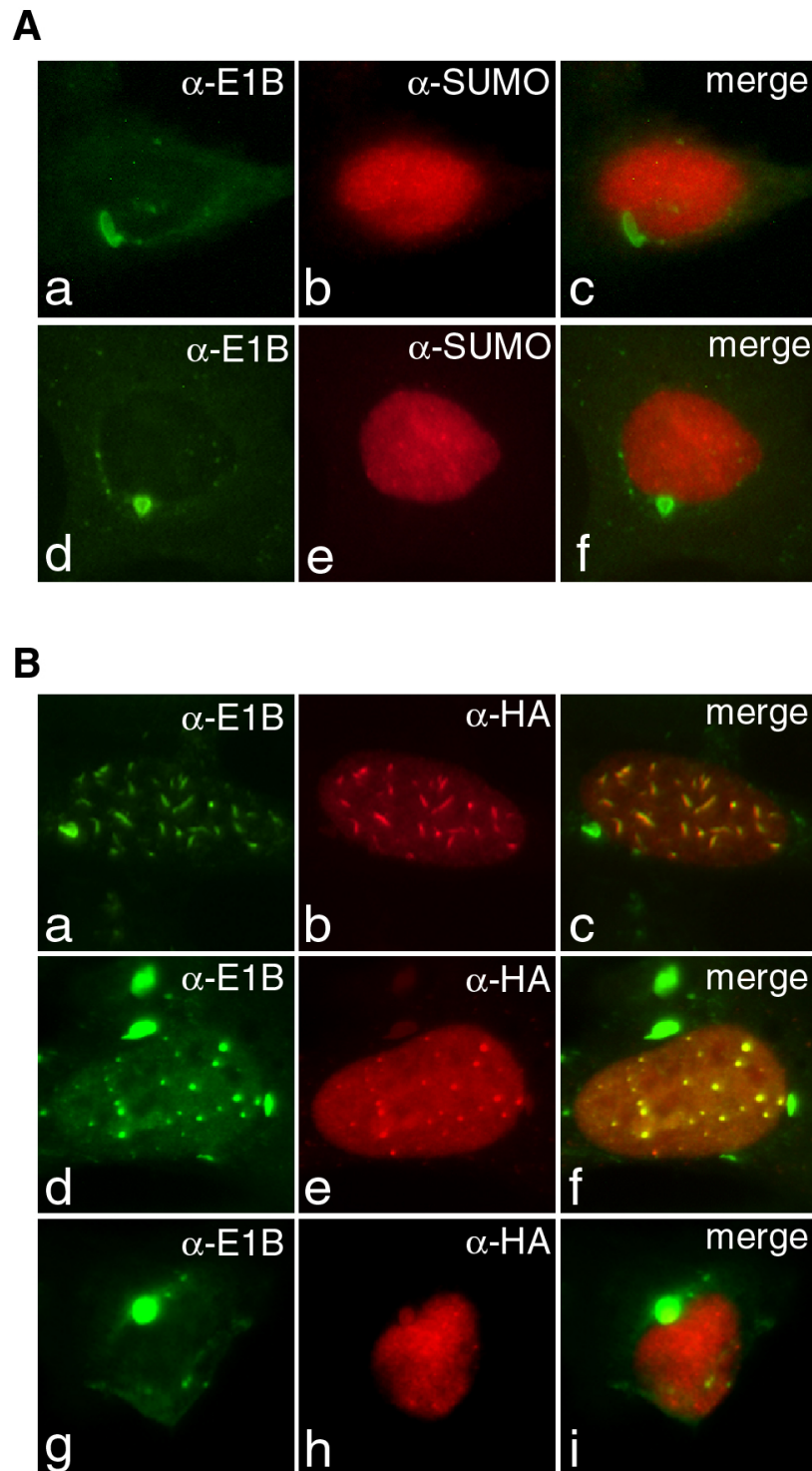


Abb. 10: Auswirkung der SUMO-1-Modifikation von Ad5 E1B-55kDa auf die subzelluläre Lokalisation in transformierten Zellen. (A) AB120 und AB19-Zellen, die stabil E1B-WT (a–c) oder E1B-K104R (d–f) exprimieren, wurden *in situ* doppelt markiert mit mAb 9C10 (α -E1B) und mAb 21C7 (α -SUMO). Diese wiederum wurden detektiert durch FITC- oder Texasrot-konjugierte Sekundärantikörper. Eine Überlagerung (merge) der Lokalisationen von E1B (grün, a und d) oder SUMO-1 (rot, b und e) ist in c und f zu sehen. (B) Auswirkung der transienten Überexpression von HA-SUMO-1 auf die Lokalisation von E1B-WT und E1B-K104R. AB120-Zellen (a–f) oder AB19-Zellen (g–i) wurden mit 4 μ g pHA-SUMO-1 transfiziert. Nach 36 h wurden die Zellen mit mAb 2A6 (grün, a, d und g) und mAb 3F10 (rot, b, e, und h) doppelt markiert. Eine Überlagerung dieser Lokalisationsmuster ist in c, f und i zusehen. Vergrößerung: x 7600.

Interessanterweise hatte die Überexpression von HA-SUMO-1 in AB19-Zellen keinen Effekt auf die Lokalisation der E1B-55kDa-K104R-Mutante (Abb. 10B g–i). In diesen Zellen blieb das mutierte Protein aus dem Zellkern ausgeschlossen und akkumulierte in dem kernnahen, zytoplasmatischen Proteinkomplex, während man das HA-SUMO-1-Fusionsprotein hauptsächlich in einer flächigen Verteilung im Zellkern beobachten konnte.

Die SUMO-1-abhängige nukleäre Lokalisation des E1B-WT-Proteins läßt vermuten, daß die Modifikation eine entscheidende Rolle bei der Steuerung des viralen Proteins innerhalb des Zellkerns zu spezifischen subnukleären Domänen (punktförmige und fadenförmige Strukturen) spielt. Alternativ könnte die Konjugation auch für den nukleären Kernimport von Bedeutung sein.

4.3.2 EINFLUß DER SUMO-1-MODIFIKATION AUF DIE PENDELAKTIVITÄT VON Ad5 E1B-55kDa

Es ist allgemein bekannt, daß der nukleäre Export von Proteinen mit einem Leucin-reichen nukleären Exportsignal (NES) abhängig ist von der Bindung an den zellulären Exportinfaktor CRM1 (*chromosome region maintainance 1*; zur Übersicht: Görlich und Kutay, 1999). Überdies kann die Interaktion der Proteine an CRM1 durch Zugabe eines Exportinhibitors, Leptomycin B (LMB), blockiert werden (Kudo *et al.*, 1998; Wolff *et al.*, 1997). Als Folge akkumulieren sogenannte Pendelproteine im Zellkern. Es wurde bereits gezeigt, daß das aminoterminal-gelegene NES des Pendelproteins Ad5 E1B-55kDa ebenfalls den CRM1-abhängigen Export des Proteins in humanen Zellen vermittelt und die Pendelaktivität des viralen Proteins durch Zugabe von LMB blockiert werden kann (Krätzer *et al.*, 2000).

Für den Fall, daß die K104R-Mutante aufgrund des fehlenden SUMO-1-Signals tatsächlich nicht mehr in den Kern dirigiert werden kann, sollte auch die Zugabe von LMB keine nukleäre Akkumulation bewirken. Zur Untersuchung dieser Vermutung wurden AB120-Zellen und AB19-Zellen vor der Fixierung mit LMB inkubiert. Anschließend indirekte Immunfluoreszenzanalysen ergaben, daß das E1B-WT-Protein abgesehen von einem kleinen Anteil, der im *Perinuclear Body* lokalisierte, hauptsächlich im Kern zurückgehalten wurde, wo es zusammen mit endogenem SUMO-1 in großen, runden Proteinkomplexen akkumulierte (Abb. 11 a–c). Im Gegensatz dazu war das E1B-K104R-Protein fast ausschließlich im Zytoplasma und vor allem im *Perinuclear Body* zu beobachten, während das endogene SUMO-

1 eine diffuse Verteilung im Kern aufwies (Abb. 11d–f). Die Beobachtung läßt vermuten, daß die K104R-Mutation im E1B-55kDa-Protein den nukleären Import des Proteins verhindert. Basierend auf diesen Ergebnissen läßt sich schlußfolgern, daß die kovalente Modifikation von Lysin 104 durch SUMO-1 sowohl für die nukleäre Akkumulation des viralen Proteins als auch für die Steuerung innerhalb des Zellkerns zu spezifischen Regionen essentiell ist.

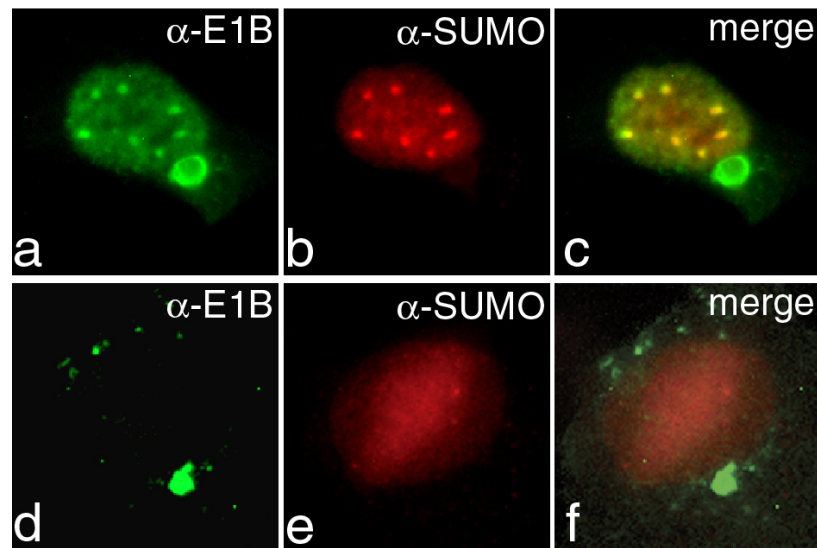


Abb. 11: Subzelluläre Lokalisation von Ad5 E1B-55kDa und SUMO-1 in Anwesenheit von LMB.

AB120- (a–c) und AB19-Zellen (d–f) wurden 3 h vor der Fixierung in einem Medium mit 10 nM LMB inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit mAbs 9C10 (grün, a und d) und mAb 21C7 (rot, b und e) doppelt markiert und danach mit entsprechenden fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern behandelt. Die Überlagerung der Bilder ist in c und f zu sehen (merge). Vergrößerung: x 7600.

4.4 ROLLE DES NES VON Ad5 E1B-55kDa UND DER SUMO-1-KONSENSUSSEQUENZ VON Ad12 E1B-54kDa IN DER TRANSFORMATION

4.4.1 AMINOTERMINALER SEQUENZVERGLEICH VON Ad5 E1B-55kDa UND Ad12 E1B-54kDa

Aufgrund der Beobachtung, daß sowohl durch die Überexpression von HA-SUMO-1 in AB120-Zellen als auch in Gegenwart von LMB das E1B-55kDa-Protein von Ad5 im Kern zurückgehalten wurde oder zu spezifischen intranukleären Regionen dirigiert wurde, konnte man vermuten, daß beide Domänen, sowohl die nukleäre Exportsequenz als auch die SUMO-1-Akzeptorregion, für die Pendelaktivität des viralen Proteins notwendig sind. Sequenzanalysen der Region von Ad5 E1B-55kDa, die die neu identifizierte SUMO-1-Akzeptorsequenz enthält, zeigten, daß das Leucin-reiche nukleäre Exportsignal nur 12 Aminosäuren von der SUMO-1-Konsensussequenz entfernt liegt. Die räumliche Nähe beider Motive spricht außerdem für eine gemeinsame Beteiligung bei der nukleozytoplasmatischen Pendelaktivität des viralen Proteins (Abb. 12).

Der Vergleich von Ad5 E1B-55kDa mit Ad12 E1B-54kDa zeigt, daß das Protein der hochonkogenen Subgruppe A in dieser Region kein äquivalentes Leucin-reiches NES besitzt. Außerdem enthält das Ad12-Protein sogar zwei, aber nicht vollständige SUMO-1-Konsensusmotive.

		Nukleäres Export Signal	SUMO-1 Konsensussequenz	
Ad5	81	AE L Y P E L RR I L T IT E DGQGLKG V K R E RGACE	111	
Ad12	65	EQQVQEGHVLDSGEGPSCADDRD K Q E K K E SL	95	

Abb. 12: Sequenzvergleich eines aminoterminalen Bereichs von Ad5 E1B-55kDa und Ad12 E1B 54kDa.
Der Sequenzausschnitt von Ad5 E1B-55kDa beginnt mit der angegebenen Position und enthält das Leucin-reiche (L) nukleäre Exportsignal (NES) und die neu identifizierte SUMO-1-Akzeptorsequenz. Dazwischen liegen nur 11 Aminosäuren. Ein äquivalenter Sequenzausschnitt von Ad12 E1B-54kDa, beginnend mit Position 65, enthält kein NES, aber zwei unvollständige SUMO-1-Akzeptorsequenzen.

In beiden Fällen fehlt vor dem **K x E**-Motiv eine aliphatische Aminosäure, die für die Funktionalität einer SUMO-Akzeptorsequenz essentiell ist.

Dieser apparente Unterschied läßt vermuten, daß Ad12 E1B-54kDa kein Substrat für die SUMO-1-Modifikation ist. Auch das fehlende NES läßt auf eine völlig unterschiedliche Lokalisation des viralen Proteins in Ad12-transformierten Zellen schließen. Untersuchungen zur Lokalisation von Ad12 E1B-54kDa in transformierten Zellen ergaben, daß das virale Protein im Gegensatz zu Ad5 E1B-55kDa fast ausschließlich gleichmäßig im Kern verteilt ist (Zantema *et al.*, 1985). Ein kürzlich identifiziertes nukleäres Lokalisationssignal (NLS) im zentralen Bereich des Ad12-Proteins und das fehlende NES könnten dafür eine Erklärung sein (Grand *et al.*, 1999).

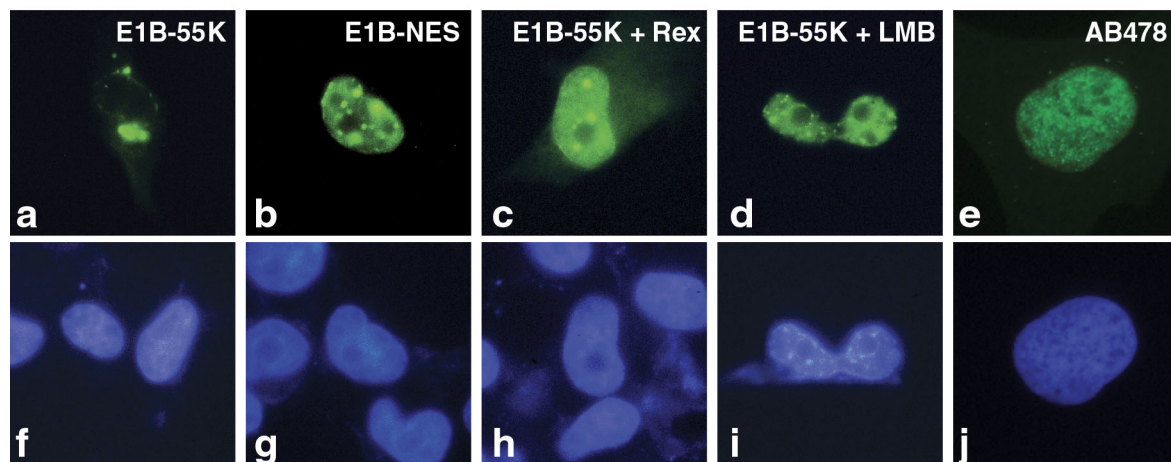
4.4.2 VERIFIZIERUNG DER PENDELAKTIVITÄT VON AD5 E1B-55KDA IN TRANSFIZIERTEN RATTENZELLEN

Es wurde mehrfach berichtet, daß die subzelluläre Lokalisation von transient exprimiertem Ad5 E1B-55kDa von der verwendeten Zelllinie und der Anwesenheit weiterer adenoviraler Proteine, wie z.B. E4orf6 abhängig ist (Goodrum *et al.*, 1996; Rubenwolf *et al.*, 1997; Zantema *et al.*, 1985). Die Arbeitsgruppe von Roland Stauber (Institut für klinische und molekulare Virologie, Universität Erlangen) konnte zum einen zeigen, daß das Onkoprotein in menschlichen Zellen (HeLa) ein hochaktives Pendelprotein ist, das unabhängig von E4orf6, p53 und Mdm2 über den CRM1-abhängigen Weg exportiert wird (Dosch *et al.*, 2001; Krätzer *et al.*, 2000). Analog zu den retroviralen Pendelproteinen HIV-1 Rev oder HTLV-1 Rex/p21 konnten sie den Export des adenoviralen Proteins durch Punktmutationen in der nukleären Exportsequenz oder durch Zugabe des Exportinhibitors LMB inhibieren (Pollard und Malim, 1998). Zum anderen konnte durch gleichzeitige Transfektion von pE1B-WT und Infektion E1B-deletierter Adenoviren in HeLa-Zellen demonstriert werden, daß die nukleozytoplasmatische Pendelaktivität des Onkoproteins im Kontext der viralen Infektion nicht beeinträchtigt wird.

Für die Pendelaktivität des viralen Proteins bzw. für die Funktionalität des nukleären Exportsignals in pE1B-WT-transfizierten Nagetierzellen gibt es allerdings noch keine gesicherten Ergebnisse. Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Ad5 E1B-55kDa wurde eine E1B-NES-Mutante konstruiert, in der die drei hydrophoben Leucinreste an Positionen 83, 87 und 91 durch Alaninreste ersetzt wurden (Abb. 12). Anschließend wurden BRK1-Zellen mit pE1B-WT, pE1B-NES oder den beiden SUMO-defizienten Mutanten pE1B-

K104R oder pE1B-V103D transfiziert und durch indirekte Immunfluoreszenz analysiert. Die Abb. 13 zeigt, daß das Gleichgewicht der Pendelaktivität von Ad5 E1B-WT, wie erwartet, auf der zytoplasmatischen Seite lag, wo es im *Perinuclear Body* konzentriert vorlag (Abb. 13A: a und f).

A



B

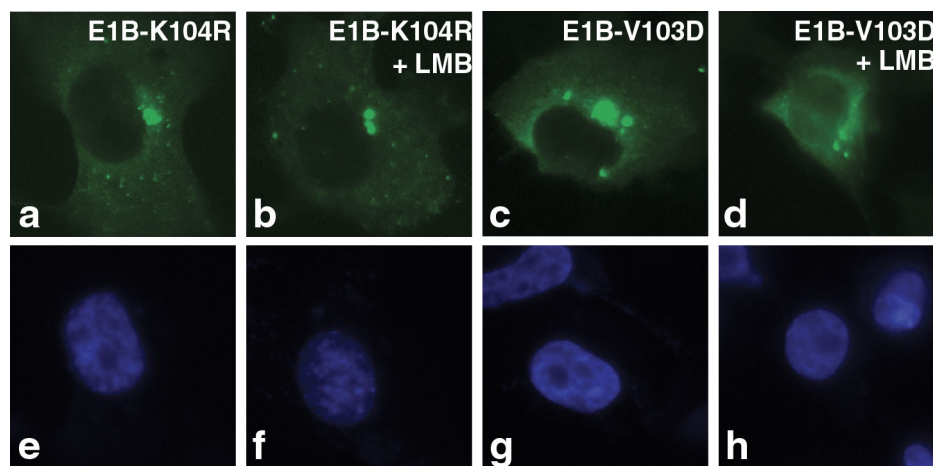


Abb. 13: Indirekte Immunfluoreszenzanalysen zur Untersuchung der Pendelaktivität von Ad5 E1B-55kDa (A) BRK1-Zellen wurden mit 1 µg der angezeigten Plasmide pE1B-WT (a, e, c, h, d und i) oder pE1B-NES (b und g) transfiziert. AB478-Zellen (e und j) exprimieren stabil Ad5 E1A und Ad12 E1B-54kDa. In c und h wurden zusätzlich 5 µg eines Plasmids, das für HTLV-1 Rex/p21 kodiert, kotransfiziert. Die Zellen wurden *in situ* mit mAb 2A6 (a–d) oder mAb XPH9 (e) markiert und anschließend mit FITC-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert (grün). (B) BRK1-Zellen wurden mit 1 µg pE1B-K104R (a, b, e und f) oder pE1B-V103D (c, d, g und h) transfiziert. Die exprimierten viralen Proteine wurden in der Immunfluoreszenz analog zu (A) mit den entsprechenden Antikörpern detektiert. Die Behandlung der Zellen mit LMB erfolgte durch Zugabe von 10 nM zum Medium 3 h vor der Fixierung mit Paraformaldehyd (A: d/B: b und d). Blau: DAPI-Färbung des Zellkerns. Vergrößerung: x 7600.

Die Mutation im NES aber verhinderte den CRM1-abhängigen Export des Protein (Abb. 13A: b und g). Infolgedessen wurde das virale Protein im Kern zurückgehalten, wo es teilweise in punktförmigen Strukturen akkumulierte. Derselbe Effekt trat durch Zugabe von LMB auf (Abb. 13A: d und i). Der CRM1-Inhibitor verhinderte ebenfalls den NES-vermittelten Export des viralen Proteins. Auch hier wurde das Ad5-Protein teilweise in punktförmigen nukleären Komplexen sequestriert. Das HTLV-1 Rex/p21-Protein verwendet bekanntermaßen fast dieselben Exportwege, scheint aber eine viel höhere Affinität zu den zellulären Exportfaktoren zu haben als E1B-55kDa (Heger *et al.*, 1999; Krätzer *et al.*, 2000). Aus diesem Grund ist das retrovirale Protein dazu in der Lage, den CRM1-abhängigen Exportweg von Proteinen mit geringerer Affinität wie z.B. von dem adenoviralen Onkoprotein, zu inhibieren. Tatsächlich bewirkte die Überexpression von HTLV-1 Rex/p21 in pE1B-WT-transfizierten BRK1-Zellen eine Blockade des adenoviralen Exports und eine Akkumulation des großen E1B-Proteins in nukleären runden Strukturen (Abb. 13A c).

Im Gegensatz zu dem Ad5-Protein von Subgruppe C konnte man Ad12 E1B-54kDa von der onkogenen Subgruppe A sowohl in transfizierten BRK1-Zellen (Daten nicht in dieser Arbeit gezeigt) als auch in AB478-Zellen, die stabil Ad5 E1A und Ad12 E1B-54kDa exprimieren, nur gleichmäßig verteilt im Zellkern beobachten (Abb. 13A e). Sogar die Inkubation dieser Zellen in LMB-versetztem Medium hatte keinen Einfluß auf die nukleäre Verteilung des viralen Proteins (Daten nicht in dieser Arbeit gezeigt). Dies läßt vermuten, daß der CRM1-Inhibitor den Export von Ad5 E1B-55kDa spezifisch blockiert, aber nicht die Ursache für die intranukleäre Akkumulation in punktförmige Strukturen ist.

Zur Überprüfung der Pendelaktivität der beiden SUMO-defizienten E1B-Mutanten in der transienten Expression wurden BRK1-Zellen mit pE1B-K104R und pE1B-V103D transfiziert und ebenfalls mit LMB behandelt. Das Ergebnis der indirekten Immunfluoreszenzanalyse war genauso wie bei der transformierten Zelllinie AB19 in Gegenwart von LMB (Abb. 11d). Beide E1B-Mutanten, K104R und V103D, waren sowohl mit als auch ohne Zugabe von LMB ausschließlich im Zytoplasma und vor allem im *Perinuclear Body* zu sehen. Der fast vollständige Ausschluß des Pendelproteins aus dem Zellkern trotz Gegenwart eines Exportinhibitors beweist, daß die beiden Punktmutationen in der SUMO-1-Akzeptorsequenz von E1B-55kDa den nukleären Import des Proteins verhindert.

4.4.3 Ad5 E1B-NES, NICHT ABER Ad12 E1B-54kDa, WIRD *IN VIVO* DURCH SUMO-1 MODIFIZIERT

Es konnte gezeigt werden, daß die aminoterminalen Region von Ad5 E1B-55kDa, die sowohl das nukleäre Exportsignal als auch die SUMO-1-Akzeptorregion enthält, bei der nukleozytoplasmatischen Pendelaktivität des viralen Proteins beteiligt ist. Darum stellte sich als nächstes die Frage, inwiefern die SUMOylierung des Onkoproteins vom nukleären Export abhängt, oder ob das Protein bei Kernretention auch modifiziert wird. Um dieser Frage nachzugehen, wurden H1299-Zellen mit pE1B-WT (Abb. 14A: Spur 1), pE1B-NES (Abb. 14A: Spur 5) oder zur Kontrolle pE1B-K104R (Abb. 14A: Spur 9) entweder ohne oder zusammen mit 12 µg, 8 µg, oder 4 µg pHA-SUMO-1 (Abb. 14A: Spuren 2–4, 6–8, 10–12) kotransfiziert. Durch anschließende Western Blot-Analyse der Gesamtzellextrakte mit mAb 2A6 konnte sowohl im Falle des E1B-WT-Proteins als auch bei der NES-Mutante eine Isoformbande bei etwa 75 kDa detektiert werden, die der HA-SUMO-1-modifizierten Form des viralen Proteins entsprach.

Interessanterweise führte der Anstieg der Transfektionsmenge von pHA-SUMO-1 (4 µg bis 12 µg) beim E1B-WT-Protein zu einer kaum merklich sichtbaren Verstärkung der Isoformbande (Abb. 14A: Spuren 4-2), während dies bei der E1B-NES-Mutante eine deutliche Stabilisierung der modifizierten Form bewirkte (Abb. 14A: Spuren 8–6).

Da die nukleäre Retention von Ad5 E1B-55kDa durch Mutation des nukleären Exportsignals keinen Hinderungsgrund für die kovalente Modifikation durch SUMO-1 darstellt, sondern sie anscheinend sogar verstärkt, stellte sich die Frage, ob das hauptsächlich nukleäre Ad12 E1B-54kDa-Protein ebenfalls Substrat für die SUMO-1-Modifikation ist. Hierzu wurden subkonfluente H1299-Zellen mit pAd5 E1B-WT, pAd12 E1B-WT zusammen mit oder ohne pHA-SUMO-1 kotransfiziert und die Gesamtzellextrakte auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Bei der Western Blot-Analyse mit mAb 2A6 oder mAb XPH9 konnte nur im Falle des Ad5-Proteins eine Isoformbande bei etwa 75 kDa detektiert werden (Abb. 14B: Spur 2), nicht aber im Falle des Ad12-Proteins (Abb. 14B: Spur 4).

Auch weitere Experimente zur Untersuchung der SUMOylierung von Ad12 E1B-54kDa z.B. durch Immunpräzipitation des viralen Proteins und anschließender Western Blot-Analyse mit mAb XPH9 oder mAb 21C7 bzw. mAb 12CA5 führten zu keinem anderen Ergebnis (nicht in dieser Arbeit gezeigt).

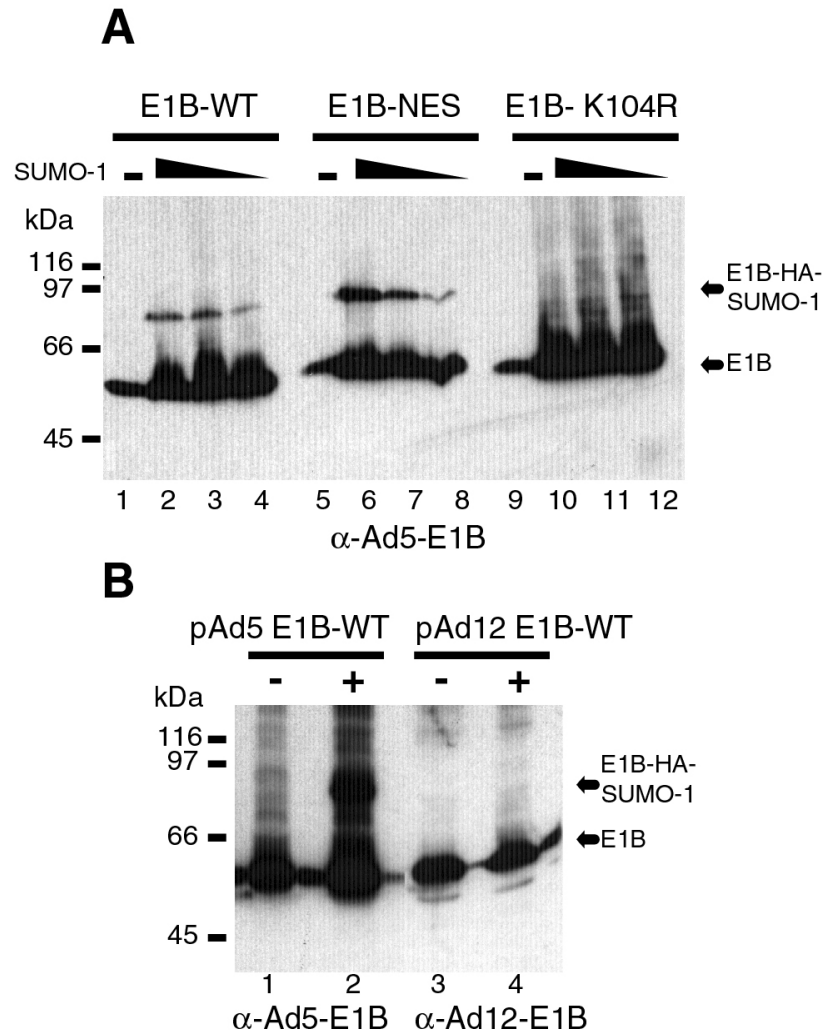


Abb. 14: SUMO-1-Modifikation von Ad5 E1B-NES, aber nicht Ad12 E1B-54kDa.

(A) Subkonfluente H1299-Zellen wurden mit je 4 μ g pE1B-WT (Spuren 1–4), pE1B-NES (Spuren 5–8) oder als Negativkontrolle pE1B-K104R (Spuren 9–12) und unterschiedlichen Mengen pHA-SUMO-1 (Spuren 4, 8, 12: 4 μ g, Spuren 3, 7, 11: 8 μ g, Spuren 2, 6, 10: 12 μ g) kotransfiziert. Durch Western Blot-Analyse der Gesamtzellextrakte mit mAb 2A6 (α -Ad5-E1B) konnte beim E1B-WT-Protein und bei der NES-Mutante eine Isoformbande in Höhe von etwa 75 kDa detektiert werden, die der HA-SUMO-1-modifizierten Form von E1B entspricht (Spuren 2–4, 6–8/siehe Pfeil). Die Zunahme der Plasmidmenge von pHA-SUMO-1 bewirkt besonders bei der NES-Mutante eine sichtbare Verstärkung der modifizierten Form (Spuren 8–6). (B) Untersuchung der SUMO-1-Modifikation von Ad12 E1B-54kDa. Subkonfluente H1299-Zellen wurden mit je 4 μ g pAd12 E1B-WT (Spuren 3 und 4) oder pAd5 E1B-WT (Spuren 1 und 2) als Positivkontrolle zusammen mit oder ohne pHA-SUMO-1 (8 μ g/Spuren 2 und 4) kotransfiziert. Durch Verwendung entsprechender Antikörper zur Detektion der großen E1B-Proteine bei der Western Blot-Analyse (α -Ad5-E1B: mAb 2A6/ α -Ad12-E1B: mAb XPH9) zeigte sich, daß nicht das Ad12 E1B-54kDa-Protein (Spur 4), sondern nur das Ad5 E1B-55kDa-Protein Substrat für die SUMO-1-Modifikation ist (Spur 2/s. Pfeil).

Aus diesem Grund kann man schlußfolgern, daß das große E1B-Protein von Ad12 im Gegensatz zu dem von Ad5 kein Substrat für die SUMO-1-Modifikation *in vivo* ist.

4.4.4 DIE INHIBITION DES NUKLEÄREN EXPORTS VON E1B-55kDa VERRINGERT NICHT SEIN KOOPERATIVES TRANSFORMIERENDES POTENTIAL

Nachdem bewiesen wurde, daß Ad5 E1B-55kDa auch in Nagetierzellen eine intrinsische Pendelaktivität besitzt, und Punktmutationen im nukleären Exportsignal nicht die *in vivo* Modifikation durch SUMO-1 verhindern, war als nächstes die Auswirkung der NES-Mutation auf die E1A-gekoppelten transformierenden Eigenschaften des viralen Proteins von Interesse. Hierzu wurde zusätzlich eine Doppelmutante von E1B-55kDa konstruiert, in der sowohl die drei Leucinreste in der NES-Sequenz durch Alaninreste, als auch der Lysinrest an Position 104 in einen Argininrest ersetzt wurden (E1B-K104R-NES).

Anschließend wurden primäre BRK-Zellen mit 4 µg pE1A zusammen mit den angegebenen Mengen (4, 6 oder 9 µg) pE1B-WT, pE1B-NES oder pE1B-K104R-NES transfiziert (Abb. 15A). Zur Kontrolle wurde außerdem pE1A alleine transfiziert.

Wie erwartet war die prozentuale *focus*-bildende Aktivität durch Kotransfektion von pE1A und pE1B-WT fast 6 mal höher als durch alleinige Transfektion von pE1A (Abb 15A). Der *focus*-bildende Effekt konnte sogar durch Erhöhung der Plasmidmenge von pE1B-WT (6 und 9 µg) auf das 12-fache verdoppelt werden. Überraschenderweise wurden die kooperativen transformierenden Eigenschaften des adenoviralen Onkoproteins nicht durch die Punktmutationen in der NES-Sequenz beeinträchtigt. Überraschenderweise war die *focus*-bildende Aktivität von E1B-NES in Kooperation mit E1A bei Transfektion von 4 µg Plasmid-DNA sogar höher als beim E1B-WT-Protein. Durch Erhöhung der Plasmidmenge auf 6 µg konnte die Anzahl der *Foci* sogar von 650 % auf fast 1.200 % im Vergleich zur *Focus*-Bildung durch E1A alleine gesteigert werden. Erst die Transfektion von 9 µg pE1B-NES verringerte die transformierende Aktivität wieder auf etwa 700 % im Vergleich zu E1A alleine.

Vermutlich spielt die durch nukleäre Retention der E1B-NES-Mutante entstandene Toxizität eine Rolle. Aus diesem Grund kann die *focus*-bildende Aktivität durch Mutation der NES-Sequenz nur in einer konzentrationsabhängigen Weise erhöht werden.

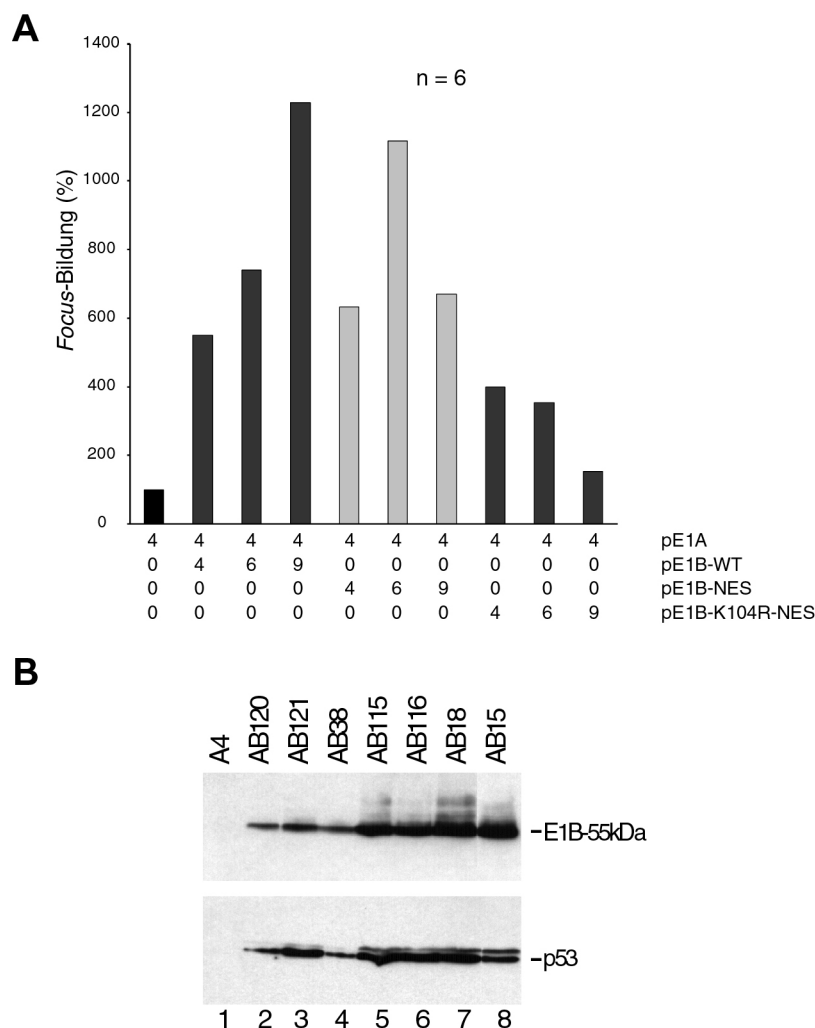


Abb. 15: Focus-Bildung durch E1B-WT, E1B-NES, oder E1B-K104R-NES in Kooperation mit E1A. (A) Primäre BRK-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmidmengen transfiziert (μg DNA auf 3×10^6 Zellen). Die *focus*-bildende Aktivität der exprimierten Proteine verhält sich prozentual zu der Anzahl an *Foci*, die durch E1A alleine induziert wurden (100 %). Die durchschnittliche Anzahl an *Foci* für E1A alleine war 3 in sechs unabhängigen Experimenten. **(B)** Aus den *Foci* der transformierten Zellen wurden mit G418-Selektion polyklonale Zelllinien etabliert. Durch Auftragen der Gesamtzellextrakte auf ein 12 %iges Polyacrylamidgel und Western Blot-Analyse (oben: 2A6, unten: mAb421) wurde die Expression von E1B-55kDa und p53 untersucht. Die Zelllinien werden in Tab. 6 näher erläutert. Als Kontrolle diente die A4-Zelllinie, die stabil die E1A-Proteine exprimiert (Spur 1).

Es wurde bereits gezeigt, daß die E1B-K104R-Mutante fast vollständig inaktiv in der kooperativen Transformation ist (Abb. 7). Um zu untersuchen, welchen Einfluß die Doppelmutation K104R-NES auf die *focus*-bildende Aktivität des viralen Proteins hat, wurden primäre BRKs ebenfalls mit pE1A und pE1B-K104R-NES transfiziert.

Überraschenderweise konnten die transformierenden Eigenschaften der SUMO-defizienten Mutante durch die Exportblockade auf das 4-fache der prozentualen *Focus*-Bildung angehoben

werden. Erst durch Erhöhung der Plasmidmenge von pE1B-K104R-NES auf 6 und 9 µg verringerte sich die Anzahl der transformierten Zellhaufen auf etwa das 2-fache der E1A-vermittelten *Focus*-Bildung. Ob hier ebenfalls eine nukleäre Retention des SUMO-defizienten Proteins bei der konzentrationsabhängigen Zunahme der E1A-gekoppelten *Focus*-Bildung eine Rolle spielte, muß noch geklärt werden.

Es konnte somit demonstriert werden, daß die Mutation des nukleären Exportsignals im Gegensatz zur Mutation der SUMO-1-Akzeptorregion von Ad5 E1B-55kDa keinen negativen Effekt auf seine transformierenden Eigenschaften hat, sondern diese sogar in einer konzentrationsabhängigen Weise erhöht.

Aus den transformierten Zellhaufen wurden, wie in Kap. 3.2.4 beschrieben, Zelllinien etabliert. Zur Untersuchung der Expression der transfizierten E1B-Konstrukte und des Tumorsuppressorproteins p53 in den Zelllinien wurden äquivalente Mengen der Gesamtzellextrakte auf ein 12 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach SDS-PAGE und Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran konnten die Proteine durch Verwendung entsprechender Antikörper (z.B. anti-E1B oder anti-p53) sichtbar gemacht werden (Abb. 15B). E1B-WT-exprimierende Zelllinien (AB120, AB121 und AB38) zeigten eine stabile Expression des viralen wie auch des zellulären Proteins (Abb. 15B: Spuren 2, 3 und 4). Ebenso verhielt es sich auch im Falle der E1B-NES-exprimierenden Zelllinien (AB115, AB116 und AB18) und der E1B-K104R-NES-exprimierenden Zelllinie (AB15). Diese exprimierten aber im Vergleich zu den WT-Zelllinien größere Mengen beider Proteine (Abb. 15B: Spuren 5, 6, 7 und 8). Als Kontrolle wurde der Gesamtzellextrakt einer E1A-exprimierenden Zelllinie (A4) aufgetragen, die überhaupt keine Expression hinsichtlich beider Proteine zeigte (Abb. 15B: Spur 1).

4.4.5 POTENTIELLE SUMO-1-KONSENSUSMOTIVE VON AD12 E1B-54kDa SPIELEN KEINE ROLLE BEI DER E1A-GEKOPPELTEN TRANSFORMATION

Wie Abb. 14B zeigt, war es nicht möglich, eine SUMO-1-modifizierte Isoformbande von Ad12 E1B-54kDa zu detektieren. Trotzdem stellte sich die Frage, ob die beiden potentiellen SUMO-1-Konsensusmotive zwischen den Positionen 88–93 des Onkoproteins analog zu dem Lysinrest 104 von Ad5 E1B-55kDa eine biologische Funktion bei der E1A-gekoppelten Transformation von Nagetierzellen übernehmen. Hierzu wurden zwei Punktmutanten konstruiert, in denen der Lysinrest an Positionen 88 oder 91 in einen Argininrest umgewandelt worden war (Ad12 E1B-

K88R und Ad12 E1B-K91R). Anschließend wurden primäre BRK-Zellen mit 4 µg pAd5 E1A zusammen mit den angegebenen Mengen (4, 6 oder 9 µg) pAd12 E1B-WT, pE1B-K88R oder pE1B-K91R transfiziert (Abb. 16). Zur Kontrolle wurden außerdem 4 µg pAd5 E1A alleine transfiziert. Der Transformations-*Assay* ergab, daß bei Transfektion von 4 µg der Ad12-E1B-Konstrukte die Punktmutationen keinen Einfluß auf die *focus*-bildende Eigenschaften hatte. In allen drei Fällen war die Anzahl der transformierten Zellhaufen ungefähr 2,5–3 mal höher als bei Transfektion von pE1A alleine (Abb. 16). Bei Transfektion größerer Mengen der E1B-Plasmide (6 und 9 µg) zeigten sich allerdings geringe Unterschiede in den transformierenden Eigenschaften zwischen dem WT-Protein und den beiden Mutanten.

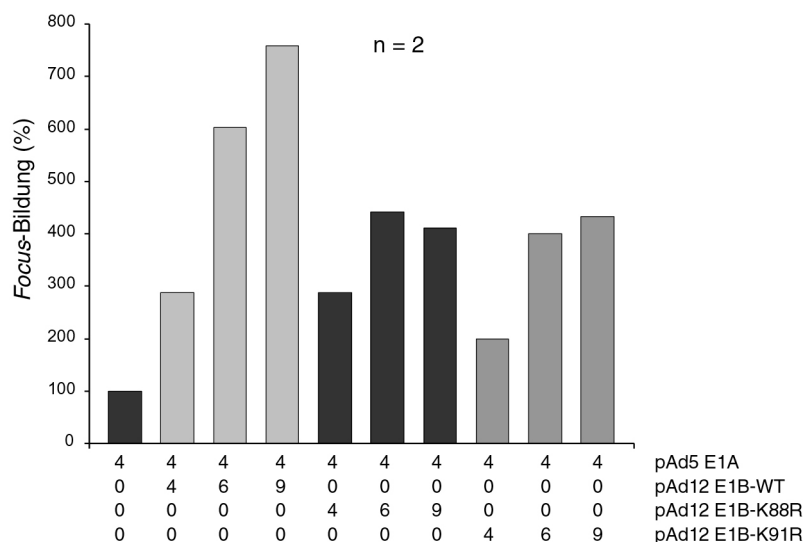


Abb. 16: Focus-Bildung durch Ad12 E1B-WT, Ad12 E1B-K88R oder Ad12 E1B-K91R in Kooperation mit Ad5 E1A. Primäre BRK-Zellen wurden mit den angegebenen Plasmidmengen transfiziert (µg DNA auf 3×10^6 Zellen). Die *focus*-bildende Aktivität der exprimierten Proteine verhält sich prozentual zu der Anzahl an *Foci*, die durch E1A alleine induziert wurden (100 %). Die durchschnittliche Anzahl an *Foci* für E1A alleine war 3 in zwei unabhängigen Experimenten.

Während im Falle des Ad12 E1B-WT-Proteins bei 6 µg 600 %, bzw. bei 9 µg fast 800 % *Focus*-Bildung im Vergleich zu E1A alleine zu beobachten war, erreichten die beiden E1B-Mutanten, K88R und K91R, mit 6 oder 9 µg um die 400 % *focus*-bildende Aktivität. Die trotzdem relativ hohe Anzahl an *Foci* im Vergleich zu der *focus*-bildenden Aktivität von Ad5 E1B-K104R (Abb. 7A) deutet darauf hin, daß die Lysinreste an Positionen 88 und 91 keine Rolle bei der Ad5 E1A-gekoppelten Transformation spielen. Andernfalls käme es wie bei Ad5 E1B-K104R zum völligen Verlust der transformierenden Eigenschaften.

Die beiden Punktmutanten erreichten zwar nicht ganz das WT-Niveau von 600 oder 800 %, da vermutlich die Stabilität oder die dreidimensionale Struktur des Ad12-Onkoproteins durch die Punktmutationen beeinträchtigt wurde. Trotzdem läßt sich aufgrund dieser Ergebnisse schlußfolgern, daß das nukleäre Ad12 E1B-54kDa-Protein *in vivo* kein Substrat für die SUMO-1-Modifikation ist, und die beiden Lysinreste an Positionen 88 und 91 innerhalb der beiden potentiellen SUMO-1-Konsensusmotive keine entscheidende biologische Funktion bei der E1A-gekoppelten Transformation übernehmen.

4.4.6 INTERAKTION VON E1B-NES UND E1B-K104R-NES MIT P53

Um zu überprüfen, ob trotz des hohen *focus*-bildenden Potentials der E1B-NES-Mutante die transformationsrelevanten Funktionen durch die Inhibition des nukleären Exports beeinträchtigt worden waren, wurden zuerst die Bindungseigenschaften zum Tumorsuppressorprotein p53 untersucht. Dazu wurden H1299-Zellen mit 1,5 µg pC53-SN3 zusammen mit 3 µg pE1B-WT (Abb 17A: Spuren 1, 4, 7 und 10), pE1B-NES (Abb 17A: Spuren 2, 5, 8 und 11), oder pE1B-K104R-NES (Abb 17A: Spuren 3, 6, 9 und 12), transfiziert. Der Gesamtzellextrakt wurde dann entweder zur Kontrolle der Gleichgewichtsmengen der exprimierten Proteine auf ein 10 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen oder vor dem Auftragen mit mAb421, mAb 2A6 oder mit einem unspezifischen Antikörper als Kontrolle immunpräzipitiert (Abb. 17). Nach der Western Blot-Analyse mit mAB421 (Abb. 17A) oder mAb 2A6 (Abb. 17B) konnte man zum einen sehen, daß die Gleichgewichtsmengen der exprimierten Proteine gleich waren (Abb. 17A: Spuren 1–3/Abb. 17B: Spuren 2–4), zum anderen wurde offensichtlich, daß sowohl mit dem E1B-WT-Protein (Abb. 17A: Spur 7), als auch mit beiden Mutanten, E1B-NES (Abb. 17A: Spur 8) und E1B-K104R-NES (Abb. 17A: Spur 9), das Tumorsuppressorprotein durch Verwendung von mAb 2A6 zu koimmunpräzipitieren war. Die Punktmutationen in der NES-Sequenz von Ad5 E1B-55kDa oder die zusätzliche Mutation der SUMO-1-Akzeptorregion verhindern somit nicht die Bindung an das Tumorsuppressorprotein p53.

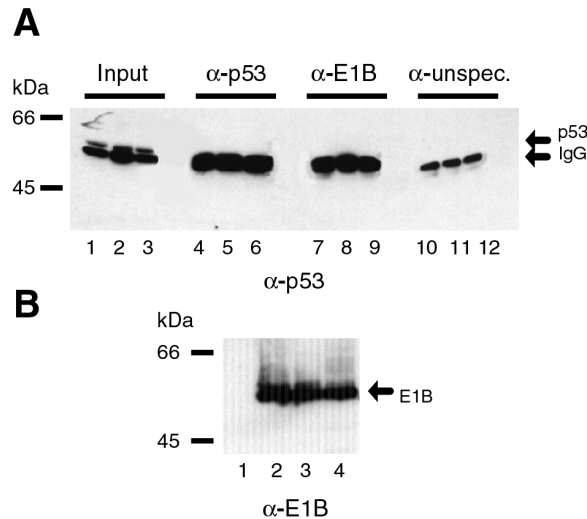


Abb. 17: Koimmunpräzipitation von p53 mit den Mutanten E1B-NES oder E1B-K104R-NES.

Subkonfluente H1299-Zellen wurden mit je 3 µg pE1B-WT (A: Spuren 1, 4, 7 und 10/B: Spur 2), pE1B-NES (A: Spuren 2, 5, 8 und 11/B: Spur 3) oder pE1B-K104R-NES (A: Spuren 3, 6, 9 und 12/B: Spur 4) zusammen mit 1,5 µg pC53-SN3 transfiziert. Zur Überprüfung der Gleichgewichtsmengen der exprimierten Proteine wurde der Gesamtzellextrakt entweder direkt auf ein 10 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen (A: Spuren 1–3/B: Spuren 1–4, Spur 1: mock) oder erst mit mAb421 (α-p53), mAb 2A6 (α-E1B) oder einem unspezifischen Antikörper (α-unspec.) immunpräzipitiert und dann aufgetragen. Die Western Blot-Analyse mit den Antikörpern mAb421 (α-p53, oben) und 2A6 (α-E1B, unten) zeigte, daß p53 sowohl mit E1B-WT (A: Spur 7), als auch mit E1B-NES (A: Spur 8) oder E1B-K104R-NES (A: Spur 9) kommunpräzipitierbar ist. Die Verwendung eines Kontrollantikörpers (A: Spuren 10–12) hingegen führte nicht zum selben Ergebnis.

4.4.7 NUKLEÄRE RETENTION VON AD5 E1B-55kDa VERSTÄRKT DIE INHIBITION DER p53 TRANSAKTIVIERUNG

Da die Inhibition des nukleären Exports von Ad5 E1B-55kDa durch Punktmutationen in der NES-Sequenz keine Auswirkung auf die Interaktion mit p53 hat, wurden als nächstes die inhibitorischen Eigenschaften der E1B-NES-Mutante und der E1B-K104R-NES-Mutante bezüglich der Transaktivierung des Tumorsuppressorproteins getestet. Die p53-negative Zelllinie H1299 wurde dafür mit den angegebenen Plasmidmengen des Reporterkonstrukts pRE-Luc zusammen mit pC53-SN3 und pE1B-WT, pE1B-NES, pE1B-K104R-NES oder einem leeren Vektor (pcDNA3) als Kontrolle kotransfiziert (Abb.18A). Durch zusätzliche Transfektion des pRL-null-Vektors war es möglich, die unterschiedlichen Expressionsmengen der Reporter-Luziferase untereinander auf einen Standard abzugleichen (s. 3.4.6). Das Ad5 E1B-55kDa-Protein konnte die p53-abhängige Induktion des Reporterkonstrukts pRE-Luc erwartungsgemäß etwa 10-fach reprimieren. Die Transfektion der doppelten (3,0 µg) und

dreifachen (4,5 µg) Menge des viralen WT-Plasmids erhöhte die Transkriptionsrepression sogar auf das maximal 20-fache (Abb. 18A).

Überraschenderweise konnte die prozentuale Repression durch die Inhibition des nukleären Exports des viralen Onkoproteins noch erhöht werden. Die Transfektion von 1,5 µg pE1BNES führte im Reporter-*Assay* zu etwa 30-facher Inhibition der p53-abhängigen Transkription, während 4,5 µg sogar eine 100-fache Repression (entspricht 1 % Luziferase-Aktivität) bewirkten (Abb. 18A). Wie in Abb. 9A schon gezeigt wurde, hat die Transfektion von 4,5 µg pE1B-K104R in einem äquivalenten Reporter-Experiment maximal eine 20–40 %ige Reduktion der p53-abhängigen Luziferase-Expression zu Folge. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob auch hier die nukleäre Retention der SUMO-defizienten Mutante, analog zum Transformationsexperiment (s. 4.4.4), die biologische Funktion des viralen Proteins wieder teilweise herstellen würde. Wie vermutet, bewirkte die Kotransfektion von 1,5–4,5 µg pE1B-K104R-NES eine 80–90 %igen Reduktion der p53-Transaktivierung (Abb. 18A).

Als nächstes wurde auch die p53-unabhängige intrinsische Repressoraktivität der E1B-Mutanten getestet. Dazu wurden Plasmide konstruiert, die für Fusionsproteine, zusammengesetzt aus der Gal4-DNA-Bindungsdomäne und E1B-WT bzw. den beiden Mutanten E1B-NES oder E1B-K104R-NES, kodieren. Nach Kotransfektion des Reporterkonstrukts pGalTK-Luc zusammen mit den angegebenen Plasmidmengen pSG424, oder den Gal4-E1B-Konstrukten, zeigte sich, daß die intrinsische Repressoraktivität des adenoviralen Proteins nicht von den Punktmutationen in der NES-Sequenz beeinflusst worden war. Beide Mutanten waren genauso wie das WT-Protein dazu in der Lage, die Transkription des TK-Promotors auf das 3-5-fache zu reprimieren (Abb. 18B).

Die Inhibition des nukleären Exports von Ad5 E1B-55kDa durch Punktmutationen in der NES-Sequenz hat also keine negative Auswirkung auf die p53-abhängigen oder p53-unabhängigen inhibitorischen Eigenschaften des Proteins, sondern verstärkt sogar die Repression der p53-vermittelten Transaktivierung. Dies korreliert mit der konzentrationsabhängigen Erhöhung der *focus*-bildenden Aktivität durch E1B-NES, wie in Abb. 15A zu sehen ist.

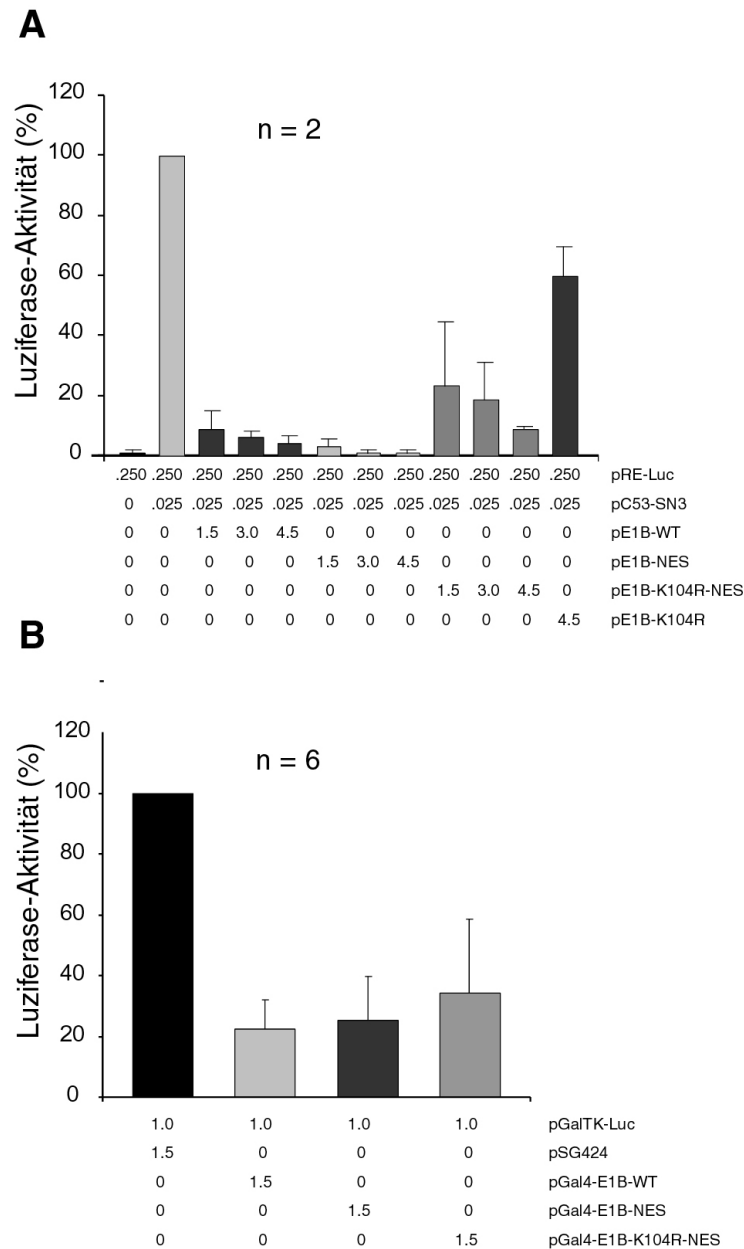


Abb. 18: Inhibition der p53-Transaktivierung durch E1B-NES und E1B-K104R-NES.

(A) Subkonfluente H1299-Zellen wurden mit den angegebenen Mengen des Reporterplasmids oder der Effektorplasmide (μg DNA) transfiziert. Die Standardabweichungen wurden aus zwei unabhängigen und jeweils doppelt ausgeführten Experimenten ermittelt. Der Wert für pE1B-K104R wurde Abb. 9 entnommen. (B) Zur Überprüfung der direkten Repression durch die beiden Mutanten E1B-NES und E1B-K104R-NES wurden subkonfluente BRK1-Zellen mit den angegebenen Mengen der Effektorplasmide und des Reporterkonstrukts transfiziert. Die Standardabweichungen setzen sich aus sechs jeweils doppelt ausgeführten Experimenten zusammen. pSG424 kodiert für die Gal4-DNA-Bindungsdomäne unter der Kontrolle des frühen SV40-Promotors. Beschreibung der rekombinanten Plasmide: s. Tab. 8.

4.4.8 POTENTIELLE SUMO-1-KONSENSUSMOTIVE VON AD12 E1B-54kDa SPIELEN KEINE ROLLE BEI INHIBITION DER p53-TRANSAKTIVIERUNG

Obwohl demonstriert wurde, daß Ad12 E1B-54kDa kein Substrat für die SUMO-1-Modifikation ist und daß beide potentiellen SUMO-1-Konsensusmotive keine vergleichbare Rolle in der Transformation wie die SUMO-1-Akzeptorsequenz von Ad5 E1B-55kDa übernehmen, war es von Interesse, zu erfahren, ob ein konservierter Austausch der Lysinreste an Positionen 88 und 91 des Ad12-Proteins einen Einfluß auf die repressorischen Aktivitäten bezüglich der p53-abhängigen Transkription hat.

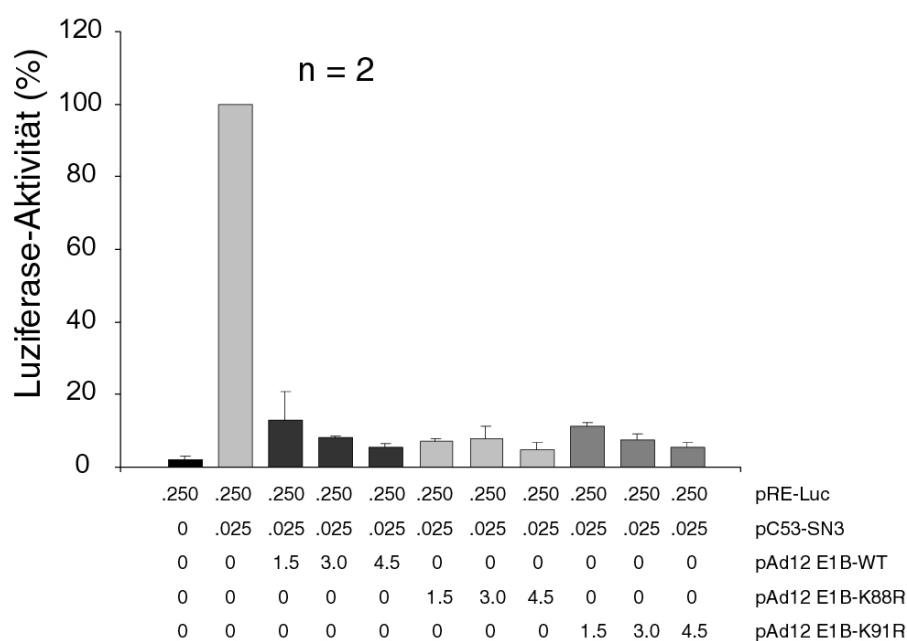


Abb. 19: Inhibition der p53-Transaktivierung durch Ad12 E1B-K88R und Ad12 E1B-K91R. Subkonfluente H1299-Zellen wurden mit den angegebenen Mengen des Reporterplasmids oder der Effektorplasmide (μg DNA) transfiziert. Die Standardabweichungen wurden aus zwei unabhängigen und jeweils doppelt ausgeführten Experimenten ermittelt.

H1299-Zellen wurden dafür mit den angegebenen Plasmidmengen des Reporterkonstrukts pRE-Luc zusammen mit pC53-SN3 und pAd12 E1B-WT, pAd12 E1B-K88R, pAd12 E1B-K91R oder einem leeren Vektor (pcDNA3) als Kontrolle kotransfiziert (Abb.19). Durch zusätzliche Transfektion des pRL-null-Vektors war es möglich, die unterschiedlichen Expressionsmengen der Reporter-Luziferase untereinander auf einen Standard abzugleichen (s. 3.4.6). Konsistent mit den Ergebnissen aus den Transformationsversuchen (Abb. 16) waren die

inhibitorischen Eigenschaften des Ad12-Proteins durch die Punktmutationen an Positionen 88 und 91 nicht beeinträchtigt. Die Kotransfektion unterschiedlicher Mengen des WT-Plasmids oder der mutierten Plasmide, K88R und K91R, führte in allen drei Fällen zu einer 10–20-fachen Reduktion der p53-abhängigen Induktion der Luziferaseexpression (Abb. 19).

Die bereits bekannte Korrelation zwischen den transformierenden Eigenschaften des großen E1B-Proteins von Ad12 und seinem Potential die p53-Transaktivierung zu inhibieren, konnte also auch für die beiden Punktmutanten bestätigt werden (Yew und Berk, 1992).

4.5 INTRANUKLEÄRE PROTEINKOMPLEXE ALS DURCHGANGSSTATIONEN WÄHREND DER PENDELAKTIVITÄT VON Ad5 E1B-55kDa

4.5.1 INTRANUKLEÄRE AKKUMULATION VON E1B-55kDa UND p53 BEI INHIBIERUNG DES NUKLEÄREN EXPORTS

In Ad5- oder Ad5-E1-transformierten Nagetierzellen befindet sich das Gleichgewicht der Pendelaktivität von E1B-55kDa fast ausschließlich auf der zytoplasmatischen Seite, wo es hauptsächlich im *Perinuclear Body* zusammen mit p53 konzentriert vorliegt (Blair Zajdel und Blair, 1988; Zantema *et al.*, 1985). Die Inkubation von AB120-Zellen mit LMB hat gezeigt, daß die Pendelaktivität des viralen Proteins blockiert werden kann durch die Inhibition des Exportinfaktors CRM1. Infolgedessen wird das Onkoprotein im Zellkern zurückgehalten und akkumuliert dort in großen runden Proteinkomplexen (Abb. 11). Aus diesem Grund stellte sich die Frage, welchen Einfluß die Inhibition des nukleären Exports von Ad5 E1B-55kDa auf die subzelluläre Lokalisation des Tumorsuppressorproteins p53 hat.

Zu diesem Zweck wurden die etablierten Zelllinien AB120, AB115, AB19 und AB15 mit oder ohne vorheriger Inkubation in LMB-versetztem Medium durch indirekte Immunfluoreszenz untersucht. E1B-WT befand sich erwartungsgemäß in unbehandelten AB120-Zellen auf der zytoplasmatischen Seite, wo es das Tumorsuppressorprotein im *Perinuclear Body* sequestrierte (Abb. 20 a–c).

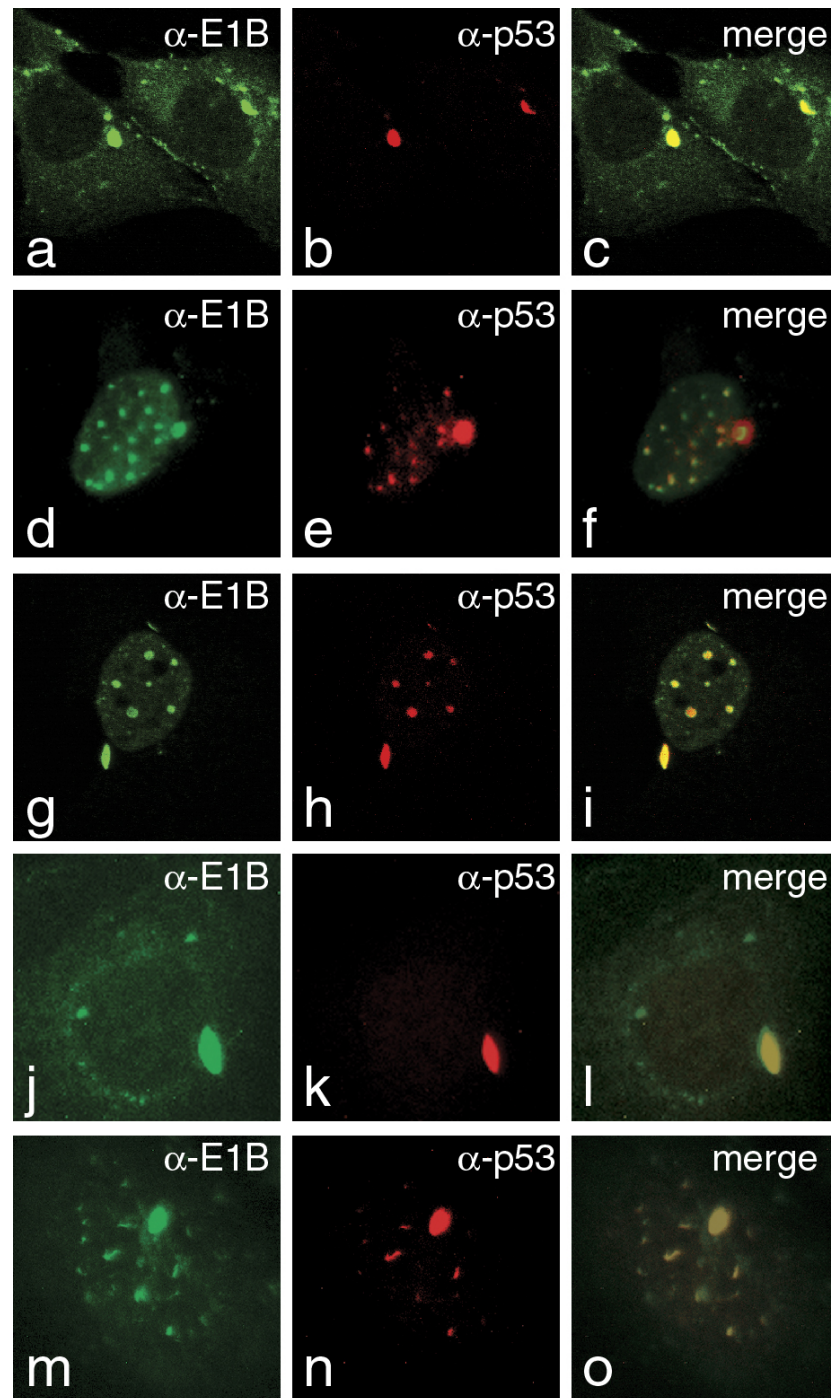


Abb. 20: Subzelluläre Lokalisation von Ad5 E1B-55kDa und p53 in transformierten Rattenzellen. AB120-Zellen (a–f), AB115-Zellen (g–i), AB19-Zellen (j–l) und AB15-Zellen (m–o) wurden *in situ* doppelt markiert mit mAb 9C10 und mAb 421. AB19-Zellen (j–l) und AB120-Zellen (d–f) wurden zusätzlich 3 h vor der Fixierung in Medium mit 10 nM LMB inkubiert. Primäre Antikörper wurden mit FITC- oder Texasrot-konjugierten Sekundärantikörper detektiert. E1B-55kDa ist grün markiert (a, d, g, j und m), p53 ist rot markiert (b, e, h, k und n). Eine Überlagerung beider Lokalisationsmuster (merge) ist in c, f, i, l und o zu sehen. Vergrößerung: x 7600.

Die Inhibition des Exports durch Zugabe von LMB bewirkte in derselben Zelllinie die nukleäre Retention des viralen Proteins (Abb. 20 d–f). Abgesehen von einem kleinem zytoplasmatischen Teil, der immer noch zusammen mit dem Tumorsuppressorprotein im *Perinuclear Body* zu beobachten war, akkumulierte das Ad5-Protein hauptsächlich in subnukleären runden Strukturen, die ebenfalls p53 enthielten. Analog dazu war das Lokalisationsmuster in AB115-Zellen (Abb. 20 g–i). Die Punktmutationen in der NES-Sequenz, die den Export des viralen Proteins blockierten, hatten zur Folge, daß das mutierte E1B-Protein hauptsächlich im Kern in großen Proteinkomplexen zusammen mit p53 vorlag. Interessanterweise sequestrierte auch hier ein kleiner Anteil beider Proteine im Zytoplasma.

Es konnte gezeigt werden, daß die E1B-K104R-Mutante in der Lage ist, mit p53 zu interagieren (Abb. 8), aber auch, daß die Mutation den Kernimport oder die intranukleäre Steuerung zu spezifischen Regionen verhindert (Abb. 11). Aus diesem Grund war es interessant zu erfahren, ob sich in Gegenwart von LMB die subzelluläre Lokalisation von p53 in AB19-Zellen ändern würde. Die Immunfluoreszenzanalyse ergab, daß das Tumorsuppressorprotein keine eigenständige Pendelaktivität besaß, sondern zusammen mit dem mutierten E1B-55kDa-Protein vornehmlich im *Perinuclear Body* akkumulierte (Abb. 20 j–l). In AB15-Zellen, die neben E1A die Doppelmutante E1B-K104R-NES stabil exprimieren, war das Lokalisationsmuster beider Proteine komplizierter (Abb. 20 m–o). Hier sequestrierten die zwei interagierenden Proteine hauptsächlich sowohl im *Perinuclear Body*, als auch in nukleären fadenförmigen Strukturen, die sich in der Morphologie von den großen, runden Proteinkomplexen im Zellkern von z.B. AB115-Zellen unterschieden.

Die Inhibition des nukleären Exports von Ad5 E1B-55kDa verhindert also nicht die Interaktion und Koloalisation mit p53. Bei intakter SUMO-1-Akzeptorsequenz akkumuliert das virale Protein infolgedessen zusammen mit dem Tumorsuppressorprotein in großen, runden Proteinkomplexen.

4.5.2 PODs ALS TRANSIENTE AUFENTHALTSSTATIONEN WÄHREND DER PENDELAKTIVITÄT VON Ad5 E1B-55kDa

Zahlreiche Publikationen anderer Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß frühe Proteine einiger DNA-Viren oft mit subnukleären Domänen assoziiert sind, die auch als PML-*oncogenic domains*, PODs, ND10, Kr-Bodies oder einfach als *Nuclear Bodies* bezeichnet werden (Everett, 2001). Diese großen Multiproteinkomplexe, die das Markerprotein PML enthalten, dienen vermutlich während der viralen Replikation als Proteinreservoir für benötigte Faktoren und werden meist in ihrer Struktur und Zusammensetzung umorganisiert. Es existieren auch viele Hinweise für eine Rolle von SUMO-1 bei der Bildung bzw. Formierung der PODs. Nicht nur zahlreiche zelluläre Proteine, sondern auch einige virale Faktoren werden durch die Modifikation zu den PODs dirigiert (s. 1.3.2). Auch für Ad5 E1B-55kDa konnte gezeigt werden, daß es teilweise mit subnukleären Domänen assoziiert, die höchstwahrscheinlich den Multiproteinkomplexen der PODs entsprechen (Doucas *et al.*, 1996).

Wie Abbildungen 10B und 11 beweisen, hat die Überexpression von HA-SUMO-1 in AB120-Zellen genauso wie die Inhibition des nukleären Exports von Ad5 E1B-55kDa eine Akkumulation des viralen Proteins zusammen mit SUMO-1 in großen runden subnukleären Proteinkomplexen zur Folge. Außerdem bewirkt die Exportblockade auch eine Sequestrierung von p53 (Abb. 20), von dem berichtet wurde, daß es ebenfalls mit PML interagieren kann, in diesen Strukturen (Pearson und Pelicci, 2001).

Zur näheren Analyse der beobachteten subnukleären Strukturen, die auch morphologische Ähnlichkeit zu den PODs besitzen, wurden die etablierten Zelllinien AB120, AB115, AB19 und AB15 mit oder ohne vorheriger Inkubation in LMB-versetztem Medium durch indirekte Immunfluoreszenz auf die Lokalisation von E1B-55kDa und PML untersucht (Abb. 21).

In AB120-Zellen, in denen sich das E1B-WT-Protein, wie schon vorher beobachtet, im Zytoplasma befand, wies das PML-Protein ein punktiertes Lokalisationsmuster im Zellkern auf (Abb. 21 a–c). Die Inhibition des nukleären Exports von Ad5 E1B-55kDa durch LMB (Abb. 21 d–f) oder durch Mutationen in der NES-Sequenz (Abb. 21 g–i) führte zur Bildung von großen sphärischen Strukturen im Zellkern, in denen PML in Anwesenheit des viralen Proteins sequestriert wurde. Interessanterweise verhinderte eine mutierte SUMO-1-Akzeptorsequenz bei gleichzeitiger Inhibition des Exports die (intra-)nukleäre Steuerung zu den subnukleären Regionen. Während in Gegenwart von LMB die E1B-K104R-Mutante abgesehen vom *Perinuclear Body* flächig über alle Zellkompartimente verteilt vorlag (Abb. 21 j–l), konnte man im Falle der E1B-K104R-NES-Doppelmutante eine teilweise unspezifische

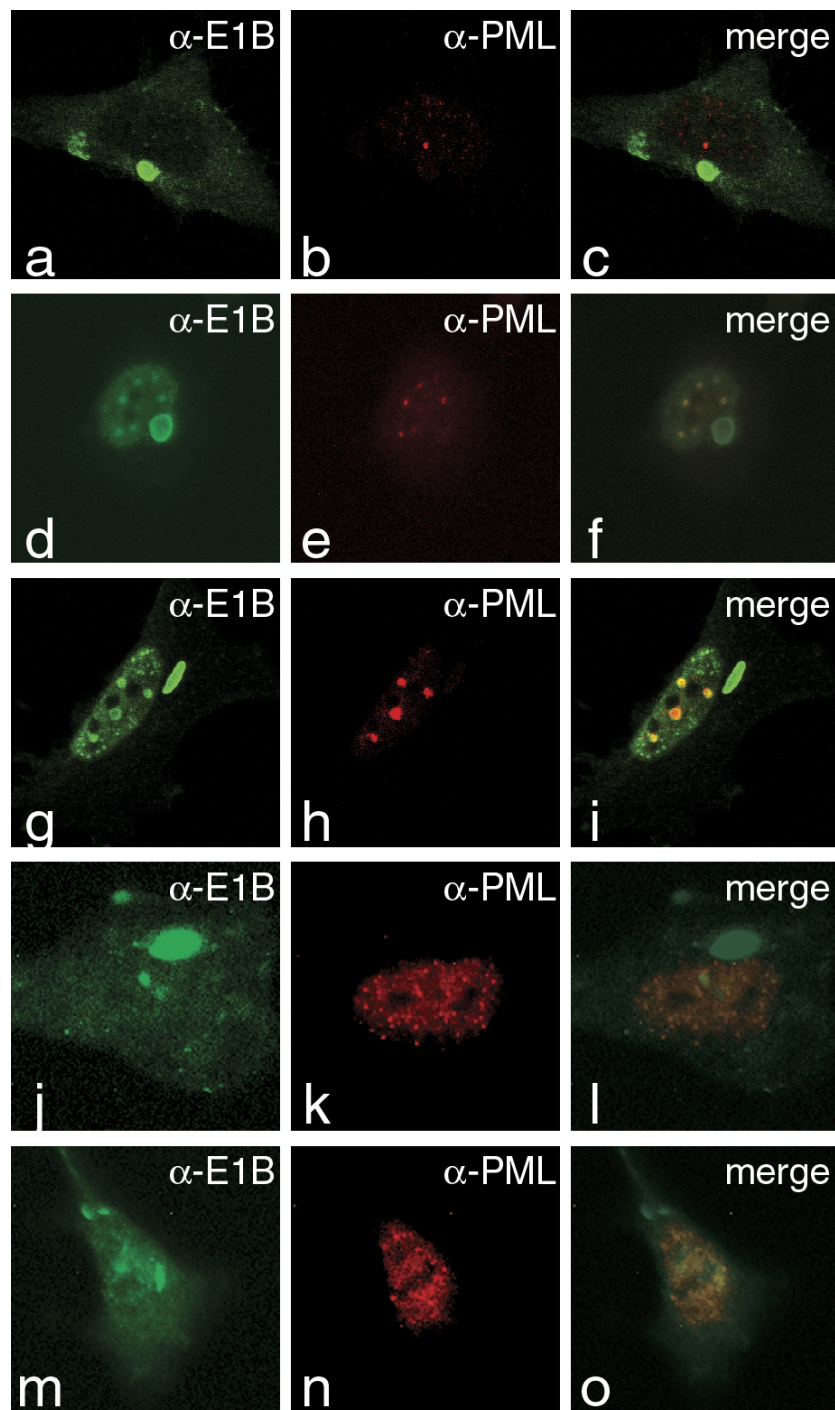


Abb. 21: Subzelluläre Lokalisation von Ad5 E1B-55kDa und PML in transformierten Rattenzellen. AB120-Zellen (a–f), AB115-Zellen (g–i), AB19-Zellen (j–l) und AB15-Zellen (m–o) wurden *in situ* doppelt markiert mit mAb 9C10 und mAb 5E10. AB19-Zellen (j–l) und AB120-Zellen (d–f) wurden zusätzlich 3 h vor der Fixierung in Medium mit 10 nM LMB inkubiert. Primäre Antikörper wurden mit FITC- oder Texasrot-konjugierten Sekundärantikörper detektiert. E1B-55kDa ist grün markiert (a, d, g, j und m), PML ist rot markiert (b, e, h, k und n). Eine Überlagerung beider Lokalisationsmuster (merge) ist in c, f, i, l und o zu sehen. Vergrößerung: x 7600.

diffuse Verteilung im Zellkern beobachten. Trotzdem ergab die Überlagerung mit PML, daß die SUMO-defizienten Mutanten nicht mit dem Markerprotein der PODs kolokalisierten. Das Verteilungsmuster von PML ähnelte eher dem von AB120-Zellen (Abb. 21 b), obwohl es den Anschein hatte, daß größere Mengen des Proteins exprimiert worden waren (Abb. 21 k und n). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß das große E1B-Protein von Ad5 während seiner Pendelaktivität in transformierten Zellen transient mit den PODs assoziiert, da bei Inhibition des Exports mit LMB das virale Protein zusammen mit p53, SUMO-1 und PML in subnukleären Proteinkomplexen akkumuliert.

Um sicher zu sein, daß diese Strukturen in AB115-Zellen ebenfalls SUMO-1 enthalten, wurden diese durch indirekte Immunfluoreszenz untersucht. Wie erwartet, konzentrierte sich die E1B-NES-Mutante abgesehen vom *Perinuclear Body* auf wenige nukleäre sphärische Proteinkomplexe, die ebenso endogenes SUMO-1 enthielten (Abb. 22 a–c). Aufgrund der Beobachtung, daß die Überexpression von pHA-SUMO-1 in AB120-Zellen zu einer Relokalisierung von E1B-55kDa in punktförmigen runden Strukturen im Zellkern führt (Abb. 10B), stellte sich die Frage, ob diese Proteinkomplexe das Markerprotein der PODs, PML, enthalten. Die indirekte Immunfluoreszenz von pHA-SUMO-1-transfizierten AB-120-Zellen demonstrierte, daß das Epitop-markierte SUMO-1, genauso wie E1B-55kDa tatsächlich mit PML in den potentiellen PODs akkumulierte (Abb 22 d–i). Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, daß SUMO-1 eine aktive Rolle bei der intranukleären Steuerung des großen E1B-Proteins von Ad5 zu den PODs in transformierten Zellen hat. Nur bei intakter SUMO-1-Akzeptorsequenz ist es möglich, durch Inhibition des nukleären Exports oder durch Überexpression von pHA-SUMO-1 das virale Protein zusammen mit p53, PML und SUMO-1 in den potentiellen PODs zu sequestrieren.

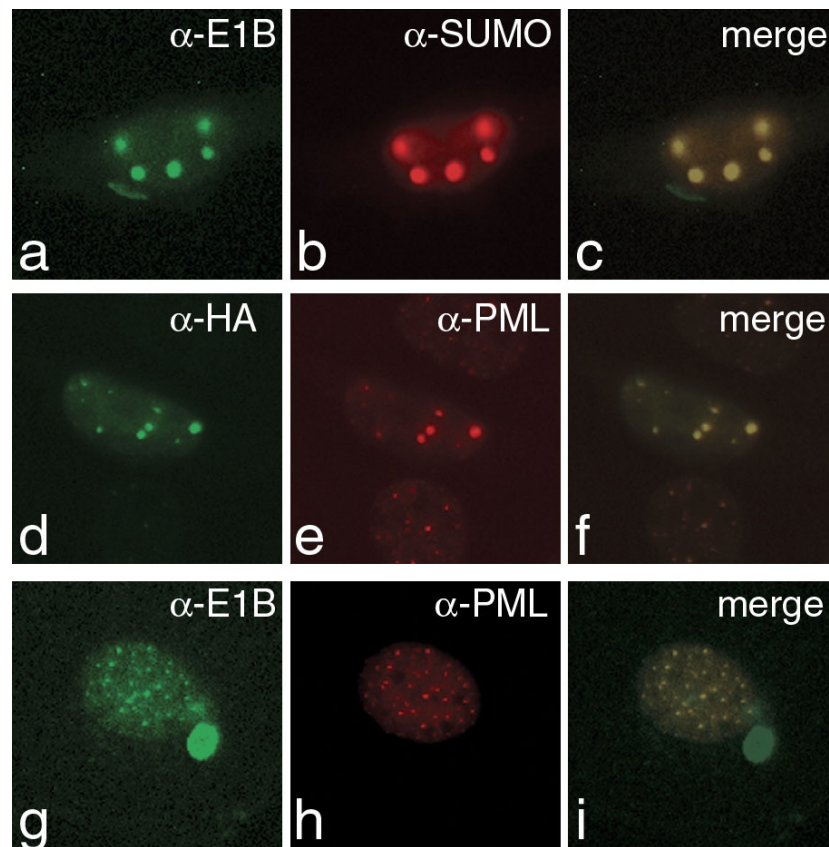


Abb. 22: Indirekte Immunfluoreszenz von AB115-Zellen und pHA-SUMO-1-transfizierte AB120-Zellen. AB115-Zellen (a–c) oder AB120-Zellen wurden *in situ* doppelt markiert mit mAb 9C10 und mAb 21C7 (a–c), mit mAb 3F10 und mAb 5E10 (d–f), oder mit mAb 9C10 und mAb 5E10 (g–i). AB120-Zellen (d–i) wurden 36 h vor der Fixierung mit 4 µg pHA-SUMO-1 transfiziert. Primäre Antikörper wurden mit FITC- oder Texasrot-konjugierten Sekundärantikörpern detektiert. E1B-55kDa bzw. das Epitop-markierte SUMO-1 ist grün markiert (a, d und g), endogenes SUMO-1 (b) bzw. PML (e und h) ist rot markiert. Eine Überlagerung beider Lokalisationsmuster (merge) ist in c, f und i zu sehen. Vergrößerung: x 7600.

5 DISKUSSION

5.1 POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATION VON Ad5 E1B-55kDa *IN VIVO*

Die biologische Funktion der meisten zellulären oder viralen Proteine wird *in vivo* durch unterschiedliche Mechanismen reguliert. Dazu gehört die Kontrolle der Proteinexpression, des Proteinabbaus sowie die Regulierung der Proteinaktivität durch Steuerung der subzellulären Lokalisation und/oder die Interaktion mit anderen Proteinen. Konstitutive oder reversible posttranslationale Modifikationen spielen dabei eine große Rolle. So kennt man bisher Acetylierungen, Methylierungen, Phosphorylierungen, ADP-Ribosylierungen, Carboxylierungen, Adenylierungen, Glykosylierungen, Prenylierungen, Ubiquitinylierungen oder die Anheftung von Ubiquitin-ähnlichen Proteinen wie z.B. SUMO-1 (Tab. 2). Die Mechanismen der verschiedenen Enzym-katalysierten Konjugationen oder die daraus resultierenden Effekte auf die Substratproteine sind zwar noch teilweise ungeklärt, doch eine wachsende Anzahl an Publikationen ermöglicht einen Einblick in die vielfältigen Möglichkeiten der Proteinregulierung auf posttranslationaler Ebene.

Die SUMO-1-Modifikation gehört neben der Ubiquitinylierung zu den am meisten untersuchten Konjugationssysteme und wurde bisher hauptsächlich mit der Regulierung von Protein-Protein-Interaktionen und/oder der subzellulären Lokalisation in Verbindung gebracht (zur Übersicht: Melchior, 2000; Muller *et al.*, 2001; Seeler und Dejean, 2001; Wilson und Rangasamy, 2001; Wilson und Rangasamy, 2001; Yeh *et al.*, 2000). Trotz unterschiedlicher Aufgaben in der Zelle ist allen Substratproteinen die SUMO-1-Konsensussequenz ψ K x E gemeinsam (Abb. 4B). Sequenzvergleiche ergaben, daß auch die großen E1B-Proteine humaner Adenoviren solche Sequenzabschnitte am Aminoterminus besitzen, die aber nur im Falle der Subgruppe B, C und D 100 %ige Übereinstimmung mit der Konsensussequenz aufweisen (Abb. 4C). In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß Ad5 E1B-55kDa von Subgruppe C kovalent durch (HA-)SUMO-1 *in vivo* am Lysinrest in der Konsensussequenz an Aminosäureposition 104 modifiziert werden kann (Abb. 5). Ein konservierter Aminosäureaustausch des Akzeptor-Lysins in Arginin oder ein Austausch der aliphatischen Aminosäure Valin (ψ) in ein Aspartat verhindern die Konjugation, während Punktmutationen in dem eng benachbarten nukleären Exportsignal (NES) keine negative Auswirkung auf die Modifikation haben (Abb. 14A).

Diese Ergebnisse korrelieren mit *in vitro* Experimenten von Rodriguez *et al.*, die zeigen, daß ein kurzes Peptidstück, das den Aminosäuren 99 bis 109 von Ad5 E1B-55kDa entspricht, in Gegenwart von weiteren gereinigten Komponenten, die für die Katalyse notwendig sind, effizient mit SUMO-1 modifiziert werden kann (Rodriguez *et al.*, 2001).

Die Detektion von SUMO-1-modifiziertem E1B-55kDa in Ad5-infizierten Zellen und die Interaktion des viralen Proteins mit der SUMO-1-Konjugase Ubc9 bestätigten den Verdacht, daß das Onkoprotein *in vivo* Substrat des SUMO-1-Konjugationssystems ist (Abb. 5). Über SUMO-2 und -3 ist abgesehen von der starken Homologie zu SUMO-1 sehr wenig bekannt. Obwohl alle drei Ubiquitin-ähnlichen Proteine anscheinend die gleichen Konjugationsenzyme verwenden, gibt es zahlreiche Hinweise, daß die Modifikation durch SUMO-2 und -3 vollkommen unterschiedliche Konsequenzen für die Zielproteine haben. Es wurde berichtet, daß zellulärer Streß wie z.B. Hitzeschock die rasche Konjugation und somit die subzelluläre Verteilung von SUMO-2 und -3 induziert, während das Lokalisationsmuster von SUMO-1 unverändert bleibt (Saitoh und Hinchey, 2000). Auch die Substratproteine scheinen verschieden zu sein, da RanGAP-1, ein klassisches SUMO-1-Zielprotein, *in vivo* nur in sehr geringer Menge von SUMO-2 oder -3 modifiziert wird, während HDAC4 ein bevorzugtes Substrat von SUMO-2 zu sein scheint (Tatham *et al.*, 2001). *In vitro* Experimente mit allen drei Ubiquitin-ähnlichen Proteinen und einer Peptidsequenz, die die SUMO-Konsensussequenz von PML enthält, demonstrierten, daß SUMO-2 und SUMO-3 aufgrund aminoterminaler ψ K x E-Motive zur Bildung von Polymeren fähig sind und als Akzeptoren für SUMO-1 als terminales Endstück dienen. Ob dies auch *in vivo* der Fall ist, muß noch untersucht werden. Substratspezifität wird höchstwahrscheinlich entweder durch erst kürzlich identifizierte E3-SUMO-1-Ligasen (Hochstrasser, 2001; Jackson, 2001; Kahyo *et al.*, 2001; Pichler *et al.*, 2002; Sachdev *et al.*, 2001; Schmidt und Muller, 2002) oder auf Ebene der proteolytischen Entfernung der Ubiquitin-ähnlichen Proteine durch spezifische Isopeptidasen (Gong *et al.*, 2000; Nishida *et al.*, 2001; Nishida *et al.*, 2000) reguliert.

In dieser Arbeit wurde demonstriert, daß Ad5 E1B-55kDa an Position 104 auch durch SUMO-2 und SUMO-3 modifiziert werden kann (Abb. 6). Allerdings konnten keine zusätzlichen Banden, die für die Anheftung von Polymeren sprechen würden, detektiert werden. Außerdem scheint die Analyse der Gesamtzellextrakte, die die *in vivo* Situation sicherlich besser widerspiegelt als die Koimmunpräzipitation in Abb. 6B, darauf hinzudeuten, daß das große E1B-Protein hauptsächlich von SUMO-1 modifiziert wird, da die Überexpression von SUMO-2 und -3 nur sehr schwache Isoform-Banden von E1B-55kDa erzeugt (Abb. 6A). Auf jeden Fall muß die Konjugation des viralen Proteins durch SUMO-2 und -3 und die biologischen

Konsequenzen durch Verwendung spezifischer Antikörper *in vivo* weiter untersucht werden. Zur weiteren Analyse der Regulation der SUMO-1-Modifikation des E1B-Proteins müssen noch die Bereiche im Ad5-Protein identifiziert werden, die für die Wechselwirkung mit Komponenten der SUMO-1-(De-)Konjugationsmaschinerie verantwortlich sind. Hierzu zählen neben Ubc9 auch die kürzlich identifizierten E3-Ligasen PIAS1, PIASy, RanBP2, eventuell noch nicht bekannte weitere SUMO-Ligasen oder auch SUMO-spezifische Isopeptidasen (Hochstrasser, 2001; Jackson, 2001; Kahyo *et al.*, 2001; Pichler *et al.*, 2002; Sachdev *et al.*, 2001; Schmidt und Muller, 2002).

5.2 DAS TRANSFORMIERENDE POTENTIAL DER GROßEN E1B-PROTEINE VON AD5 UND AD12

5.2.1 Ad5 E1B-55kDa

Das transformierende Potential von Ad5 E1B-55kDa bei der E1A-gekoppelten Transformation wurde bisher ausschließlich mit der Bindung an p53 und der Inhibition seiner transaktivierenden Eigenschaften in Verbindung gebracht. Die erforderlichen Domänen für die Interaktion mit p53 befinden sich im Bereich der Aminosäure Position 180 und im zentralen Bereich, während sich die Domänen für die p53-Repression am Carboxyterminus befinden (Abb. 23). Posttranslationale Modifikation durch Phosphorylierungen der Aminosäurereste an Positionen Ser-490, Ser-491 und Thr-495, die in einer Kasein-Kinase II-Konsensussequenz liegen, scheinen sowohl für die transformierenden Eigenschaften als auch für die Inhibition der p53-abhängigen und p53-unabhängigen Transkription essentiell zu sein (Teodoro und Branton, 1997; Teodoro *et al.*, 1994). Die Inaktivierung des zellulären Tumorsuppressorproteins p53 stellt einen zentralen Mechanismus dar, über den Onkoproteine verschiedener Tumerviren zur Transformation und Tumorentstehung beitragen. Trotzdem ist noch vollkommen unklar, auf welche Weise E1B-55kDa die antivirale Aktivität von p53 reprimiert, und welche weiteren Funktionen und Protein-Interaktionen für diese Aktivität notwendig sind. Durch die Analyse der beiden SUMO-1-defizienten E1B-Mutanten (E1B-K104R und E1B-V103D) in der Transformation wurde die SUMO-1-Akzeptorregion als weitere transformationsrelevante Domäne im Ad5 E1B-55kDa-Protein identifiziert (Abb. 23). Damit konnte zum erstmals die posttranslationale Modifikation eines viralen Proteins durch

SUMO-1 mit der Umwandlung nicht-permissiver Zellen zum transformierten Phänotyp in Verbindung gebracht werden.

In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurde demonstriert, daß die Punktmutationen in der SUMO-1-Akzeptorsequenz zwar keinen Einfluß auf die Interaktion mit p53 haben (Abb. 8), aber das inhibitorische Potential des viralen Proteins bezüglich der p53-abhängigen Transkriptionsaktivierung vollkommen verloren geht (Abb. 9A).

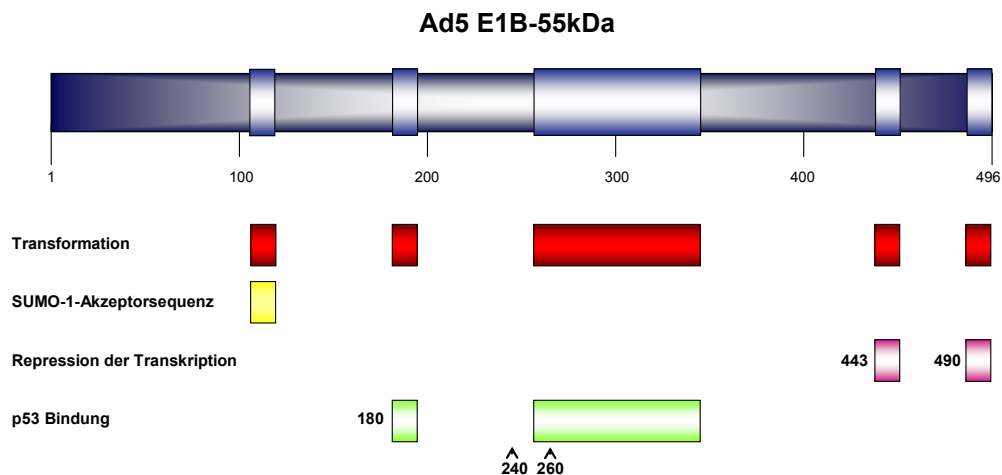


Abb. 23: Schematische Darstellung der transformationsrelevante Domänen von Ad5 E1B-55kDa und ihre Funktionen. Nummern kennzeichnen jeweils die Position der ersten Aminosäure in den bekannten Motiven. Pfeile entsprechen der Position bereits charakterisierter Punktmutanten. Die neu identifizierte SUMO-1-Akzeptorsequenz befindet sich im Aminosäurebereich 103-106. Siehe auch Abb. 4 und 2.

Die Verwendung unterschiedlicher Mengen der mutierten E1B-Plasmide in den Reporter- oder Transformations-Experimenten zeigte, daß nicht die verminderte Proteinstabilität des viralen Onkoproteins, hervorgerufen durch die Punktmutationen, die Ursache der drastischen Reduktion der *focus*-bildenden oder repressorischen Aktivität war. Interessanterweise blieb die p53-unabhängige intrinsische Repressoraktivität des adenoviralen Proteins trotz der Mutationen erhalten (Abb. 9B), was darauf hindeutete, daß die SUMO-1-Modifikation spezifisch für die Inhibition der p53-Transaktivierung notwendig ist, während andere Funktionen des viralen Proteins von der Konjugation nicht beeinträchtigt werden.

Angeichts der Tatsache, daß E1B-55kDa in Ad5-transformierten Zellen zusammen mit p53 im Zytoplasma in einem kernangrenzenden Proteinkomplex akkumuliert (Zantema *et al.*, 1985), der vermutlich das Zentrosom repräsentiert, stellte sich die Frage, ob neben der Bindung und Inaktivierung des Tumorsuppressorproteins auch die Kontrolle der subzellulären Lokalisation des viralen Onkoproteins eine Rolle bei der Transformation spielt. In diesem Zusammenhang

wurde vor kurzem in enger Nachbarschaft zu der identifizierten SUMO-1-Akzeptorsequenz eine Leucin-reiche Domäne entdeckt. Diese ist vermutlich beim nukleozytoplasmatischen Transport viraler Transkripte während der viralen Replikation beteiligt, und vermittelt unabhängig von p53, Mdm2, E4orf6 oder anderen adenoviralen Proteinen den Export des viralen Proteins (Abb. 12; Dosch *et al.*, 2001; Krätzer *et al.*, 2000).

In eukaryotischen Zellen ist der Transport von Makromolekülen vom Zellkern ins Zytoplasma ein aktiver, bidirektionaler Prozeß, der über die NPCs in einer temperatur-, energie- und signalabhängigen Weise vermittelt wird (Görlich und Kutay, 1999; Görlich und Mattaj, 1996). Man weiß mittlerweile, daß hierbei nukleäre Rezeptoren mit der Leucin-reichen Sequenz (NES) des zu exportierenden Proteins interagieren und den Transport über die Kernporen ermöglichen. Der bekannteste und am besten charakterisierte Rezeptor ist CRM1 (*chromosomal region maintenance 1*), auch als Exportin 1 oder Kap124 geläufig, der als genereller Exportrezeptor zum einen an Komponenten der nukleären Exportmaschinerie, den Kernporen, wie z.B. RanGTP, andererseits an Proteine mit nukleärem Exportsignal, wie z.B. die retroviralen Protein Rex/p21 (HTLV-1) oder Rev (HIV-1), bindet (Elfgang *et al.*, 1999; Fornerod *et al.*, 1997; Fukuda *et al.*, 1997; Gerace, 1995; Ossareh-Nazari *et al.*, 2001; Stade *et al.*, 1997). Die Untersuchungen des nukleozytoplasmatischen Transports wurden erleichtert durch die Entdeckung von Leptomycin B (LMB), eines CRM1-Inhibitors, der spezifisch an den Exportfaktor bindet, seine Funktion blockiert, und die nukleäre Retention von Proteinen mit NES-Sequenz induziert (Kudo *et al.*, 1998; Stade *et al.*, 1997; Wolff *et al.*, 1997; Yoshida und Horinouchi, 1999).

Um den Einfluß der subzellulären Lokalisation von Ad5 E1B-55kDa auf die Transformation zu untersuchen, wurden unterschiedliche Mengen einer NES-mutierten E1B-Mutante in der Transformation eingesetzt (Abb. 15A). Überraschenderweise verstärkte die Inhibition des Exports die *focus*-bildende Aktivität im Vergleich zum E1B-WT-Protein. Allerdings schien die Toxizität des viralen Proteins durch die nukleäre Akkumulation gestiegen zu sein, da sich bei Transfektion von 9 µg pE1B-NES die prozentuale Anzahl der *Foci* wieder stark verringerte. Untersuchungen zur funktionellen Aktivität der NES-Mutante ergaben, daß die nukleäre Retention erwartungsgemäß keinen Einfluß auf die Interaktion mit p53 oder auf die p53-unabhängige intrinsische Repressoraktivität hatte (Abb. 17, 18B), aber die inhibitorische Wirkung des viralen Onkoproteins auf die p53-abhängige Transaktivierung entscheidend verstärkte (Abb. 18A). Während das E1B-WT-Protein die Transaktivierung der Luziferase durch das Tumorsuppressorprotein maximal 20-fach reprimierte, bewirkte die Inhibition des nukleären Exports maximal die 100-fache Repression. Diese Ergebnisse erhärten den Verdacht,

daß die nukleäre Lokalisation des viralen Onkoproteins eine entscheidende Rolle bei der Transformation spielt. Die Inhibition des nukleären Exports des Proteins konnte die *Focus*-Bildung und die transformationsrelevanten reprimierenden Eigenschaften des Ad5-Proteins bezüglich der Apoptose-Induktion durch p53 beträchtlich steigern. Dies läßt vermuten, daß die Inhibition des Tumorsuppressors im Zellkern stattfindet. Außerdem implizieren diese Ergebnisse eine aktive Pendelbewegung des viralen Proteins in transformierten Zelllinien zwischen dem Kern und dem Zytoplasma, wobei das Gleichgewicht auf der zytoplasmatischen Seite liegt. Analog dazu konnte auch gezeigt werden, daß in Ad5-infizierten Zellen ein Komplex aus E1B-55kDa und E4orf6 kontinuierlich zwischen Zellkern und Zytoplasma hin und herpendelt (Dobbelstein *et al.*, 1997). Während die Pendelbewegung bei der viralen Replikation höchstwahrscheinlich essentiell für den Transport viraler Transkripte ist, bleibt die biologische Konsequenz der Pendelaktivität des E1B-Proteins bei der Umwandlung primärer Nagetierzellen in transformierte Zellen offen. Wichtig ist hierbei vor allem die Steuerung des viralen Proteins in den Kern, nicht aber der NES-vermittelte Export aus dem Kern.

Die posttranslationale Konjugation durch SUMO-1 wurde häufig mit dem nukleären Import von Substratproteinen in Verbindung gebracht. Das BPV E1-Protein z.B. ist als Hauptinitiatorprotein der viralen DNA-Replikation beteiligt bei der Bildung des episomalen viralen Genoms im Wirts-Zellkern. Es konnte gezeigt werden, daß Punktmutationen in E1, die die SUMOylierung verhindern, gleichzeitig auch die nukleäre Akkumulation des frühen Proteins und somit auch die virale Replikation verhindern (Rangasamy und Wilson, 2000; Rangasamy *et al.*, 2000). Noch interessanter ist die Entdeckung von RanBP2/Nup358 als E3-SUMO-1-Ligase (Pichler *et al.*, 2002). Ursprünglich ist es als Komponente der nukleozytoplasmatischen Transportmaschinerie bekannt, das sich zusammen mit RanGAP1 hauptsächlich an den zytoplasmatischen Filamenten der Kernporen aufhält und die GTP-Hydrolyse von Ran zur Energiebereitstellung für den Import von Proteinen reguliert (Görlisch und Kutay, 1999). Sowohl für RanGAP1 als auch für RanBP2 konnte die Interaktion mit Ubc9 und die Konjugation durch SUMO-1 nachgewiesen werden. (Mahajan *et al.*, 1997; Saitoh *et al.*, 1998). Pichler *et al.*, konnten zeigen, daß RanBP2 den SUMO-1-Transfer von Ubc9 auf Sp100, einem nukleärem Transkriptionsfaktor, katalysiert und dadurch den nukleären Import des Proteins ermöglicht (Sternsdorf *et al.*, 1999; Sternsdorf *et al.*, 1997). Die SUMO-1-Modifikation durch RanBP2 als Voraussetzung für den nukleären Import könnte durchaus ein genereller Prozess sein, der auch bei anderen zellulären oder viralen Proteinen zutrifft.

Hinweise auf eine SUMO-1-vermittelte Steuerung des E1B-55kDa-Proteins in den Zellkern lieferten in dieser Arbeit Immunfluoreszenz-Experimente mit Zelllinien, die stabil das E1B-

55kDa-WT-Protein (AB120) oder die SUMO-defiziente Mutante E1B-K104R (AB19) exprimieren. Durch Überexpression von Epitop-markierten SUMO-1 in den WT-Zellen konnte das E1B-Protein in den Kern dirigiert werden (Abb. 10B). Ebenso führte die Gegenwart von LMB zu einer nukleären Retention des viralen Proteins (Abb. 11/13A d). Interessanterweise hatte weder die Überexpression von SUMO-1 noch die Inhibition des Exports durch LMB einen Einfluß auf die zytoplasmatische Lokalisation der K104R-Mutante (Abb. 10B, 11, 13B b und d). Entweder verhinderte die Punktmutation den Kernimport oder die Retention im Kern. Aufgrund dieser Ergebnisse und der Tatsache, daß das nukleäre Exportsignal nur 12 Aminosäuren von der SUMO-1-Akzeptorsequenz im E1B-Protein entfernt liegt, stellte sich die Frage, ob zwischen beiden Domänen ein funktioneller Zusammenhang besteht (Abb. 12). Bei der Überprüfung der SUMOylierung der NES-Mutante stellte sich heraus, daß die Inhibition des nukleären Exports kein Hindernis für die Konjugation darstellt, sondern sich sogar stabilisierend auf die modifizierte E1B-Isoformbande auswirkt (Abb. 14A). Dies legt den Verdacht nahe, daß der stationäre Aufenthalt des mutierten Proteins im Zellkern die SUMO-1-Modifikation begünstigt oder verlängert.

Da die transformierenden und inhibitorischen Eigenschaften von E1B-55kDa durch die nukleäre Retention (NES) gesteigert wurden, bestand die Möglichkeit, daß die biologischen Funktionen der K104R-Mutante bei der Transformation durch zusätzliche Inhibition des nukleären Exports wieder teilweise hergestellt würden. Tatsächlich war die prozentuale *Focus*-Bildung durch E1A und E1B-K104R-NES signifikant höher als bei der K104R-Mutante mit intakter NES-Sequenz. Allerdings schien die Transformations-Induktion, analog zu E1B-NES, konzentrationsabhängig zu sein, da eine Steigerung der Plasmidmenge der Doppelmutante die Anzahl der *Foci* kontinuierlich verringerte (Abb. 15A). Konsistent mit diesen Ergebnissen war auch eine teilweise Wiederherstellung der inhibitorischen Eigenschaften bezüglich der p53-Transaktivierung durch die zusätzliche Exportinhibition zu beobachten, allerdings wurde durch die Doppelmutante nie mehr als die Hälfte des inhibitorischen Potentials des E1B-WT-Proteins erreicht (Abb. 18A). Dies bestätigte den Verdacht, daß die nukleäre Lokalisation des viralen Onkoproteins Voraussetzung für die Transformation bzw. Inhibition der p53-abhängigen Transkriptionsaktivierung ist, aber eine intakte SUMO-1-Akzeptorsequenz erst eine effiziente Umwandlung in transformierte Zellen und die vollständige Repression der p53-Induktion zuläßt. Neben einer Beteiligung am E1B-Import hat SUMO-1 in diesem Fall vermutlich weitere intranukleäre Aufgaben, die für die biologischen Funktionen des Ad5-Proteins essentiell sind.

5.2.2 Ad12 E1B-54kDa

Die Eigenschaften und Funktionen des großen E1B-Proteins von Ad12 der hochonkogenen Subgruppe A bei der Transformation scheinen nur teilweise mit denen von Ad5 E1B-55kDa zu überlappen. Es wurde beobachtet, daß der Virus-Serotyp der E1B-Gene die Tumorigenität von Ad E1-transformierten Zellen, die in immunsupprimierte Nagetiere injiziert wurden, bestimmt (Bernards und Van der Eb, 1984). Obwohl Ad12 E1B-54kDa, analog zu Ad5 E1B-55kDa, kein eigenes Transformationspotential besitzt, sondern die Transformationseffizienz der E1A-Proteine um ein Vielfaches steigert, sollte erwähnt werden, daß das virale Protein alleine die Lebensdauer von humanen Zellen in Kultur verlängern kann, ohne sie zu immortalisieren (Gallimore *et al.*, 1985; Gallimore *et al.*, 1997; van den Elsen *et al.*, 1983). Während es bisher noch nicht gelang, eine starke Affinität von E1B-54kDa zum Tumorsuppressorprotein p53 nachzuweisen, konnte trotzdem gezeigt werden, daß die transkriptionsaktivierenden Eigenschaften von p53 in genauso hohem Umfang von dem viralen Protein reprimiert werden, wie von dem homologen Protein von Ad5 (Grand *et al.*, 1994; Yew und Berk, 1992). Allerdings ist das Ad12-Protein dazu in der Lage, auch die p53-induzierte Transkriptionsrepression *in vivo* aufzuheben (Jackson *et al.*, 1993; Steegenga *et al.*, 1995; Subler *et al.*, 1992; Subler *et al.*, 1994).

In Ad12 E1-transformierten Zellen unterscheidet sich das Lokalisationsmuster des Tumorsuppressorproteins und des großen E1B-Proteins von Ad5 E1-transformierten Zellen. Ad12 E1B-54kDa befindet sich hier hauptsächlich zusammen mit p53 im Zellkern in einer diffusen Verteilung, abgesehen von einem kleinem zytoplasmatischen Anteil (Grand *et al.*, 1993; Mak *et al.*, 1988; Zantema *et al.*, 1985; Zantema *et al.*, 1985). Die zahlreichen Unterschiede und Gemeinsamkeiten beider E1B-Proteine von Ad5 und Ad12 fordern viele Fragen heraus, wie z.B., ob der Mechanismus zur Inaktivierung von p53 während der Transformation in beiden Serotypen der gleiche ist und welche weiteren Funktionen das Ad12 E1B-54kDa-Protein noch besitzt, die zu der hohen Onkogenität des Serotyps beitragen.

Aufgrund sequentieller Vergleiche beider Polypeptide war es möglich, die Unterschiede in der Lokalisation in E1-transformierten Zellen zu erklären. Grand *et al.* identifizierten im zentralen Teil des Ad12 E1B-54kDa-Proteins ein starkes nukleäres Lokalisationssignal (zwischen Positionen 228 und 239), das für die Kernretention des Proteins verantwortlich ist (Grand *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu wurde keine vergleichbare basische Sequenz im großen E1B-Protein von Ad5 gefunden (Goodrum *et al.*, 1996). Außerdem weist die Aminosäuresequenz von Ad12 E1B-54kDa kein Leucin-reiches nukleäres Exportsignal auf, wie es am

Aminoterminus von Ad5 E1B-55kDa-Protein gefunden wurde (Abb. 12; Krätzer *et al.*, 2000). In Ad12 E1-transformierten Zellen befindet sich das große E1B-Protein vermutlich permanent im Zellkern und pendelt nicht zwischen beiden Zellkompartimenten hin und her. Ob dies ebenso in infizierten Zellen der Fall ist, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

In dieser Arbeit wurde ein aminoterminaler Bereich im Ad12 E1B-54kDa-Protein identifiziert, der zwei Domänen enthält, die starke Ähnlichkeit mit der SUMO-1-Konsensussequenz ψ K x E besitzen. Allerdings fehlen für die vollständige Übereinstimmung die aliphatischen Aminosäuren (ψ), die für die Konjugation durch SUMO-1 essentiell sind. Aus diesem Grund schlugen verschiedene Versuche, die SUMO-1-Modifikation von Ad12 E1B-54kDa nachzuweisen, fehl (Abb. 14B). Um zu untersuchen, ob die entsprechenden Lysinreste an Positionen 88 und 91, die als potentielle Akzeptorstellen für die SUMO-1-Konjugation dienen würden, trotzdem, analog zu Lys104 von Ad5 E1B-55kDa, eine Rolle bei der Transformation spielen, wurde die *focus*-bildende Aktivität beider Punktmutanten (K88R und K91R) bestimmt (Abb. 16). Trotz geringer Unterschiede, die sich erst bei erhöhten Transfektionsmengen der E1B-Plasmide widerspiegelte, war die Anzahl der *Foci* im Fall der beiden Ad12 E1B-Punktmutanten verglichen mit dem Ad12 E1B-WT-Protein annähernd gleich. Im Gegensatz zum vollkommenen Verlust der transformierenden Eigenschaften durch Mutationen in der SUMO-1-Akzeptorsequenz von Ad5 E1B-55kDa, war bei Ad12 keine derartig gravierende Konsequenz auf die biologischen Funktionen des großen E1B-Proteins festzustellen. Die Ursache der leichten Reduktion der *Foci*-Anzahl bei den beiden Punktmutanten lag vermutlich in der geringeren Proteinstabilität oder in der veränderten Sekundärstruktur. Als weiterer Beweis dafür, daß beide potentiellen SUMO-1-Akzeptorsequenzen im E1B-54kDa-Protein keine transformationsrelevanten Funktionen übernehmen, wurden beide Lysin-Punktmutanten auf ihre repressorischen Eigenschaften bezüglich der p53-Transaktivierung getestet (Abb. 19). Der Reporter-*Assay* bewies, daß der konservierte Austausch beider Lysinreste an Position 88 und 91 keinen Einfluß auf die Inhibition der p53-abhängigen Transkriptionsaktivierung hatte. Dies erhärtete den Verdacht, daß das große E1B-Protein von Ad12 weder Substrat für die SUMO-1-Modifikation ist, noch daß beide potentiellen SUMO-1-Akzeptorsequenzen eine Rolle bei der E1A-gekoppelten Transformation von Nagetierzellen spielen. Durch die fast ausschließlich nukleäre diffuse Lokalisation des viralen Proteins in Ad12-transformierten Zellen ist die Modifikation von Ad12 E1B-54kDa durch SUMO-1, angesichts der Rolle des Ubiquitin-ähnlichen Proteins beim Kernimport von Ad5 E1B-55kDa, schwer vorstellbar. Die vollständige Funktionsfähigkeit der beiden Punktmutanten bei der Transformation und Inhibition der p53-Transaktivierung jedenfalls scheint darauf hinzuweisen, daß das Ad12 E1B-

54kDa-Protein andere transformationsrelevante Eigenschaften besitzt. Zahlreiche Arbeitsgruppen konnten tatsächlich zeigen, daß ein aminoterminaler Bereich des großen E1B-Proteins von Ad12 (1–149), nicht aber von anderen Serotypen, in der Lage ist, in humanen Zellen an vier chromosomalen, transkriptionsaktiven Stellen Bruchstellen zu erzeugen. Es konnte gezeigt werden, daß diese Bereiche Tandemwiederholungen der Genfamilien der U1 snRNA, der U2 snRNA, der U1 snRNA-Pseudogene, und der 5S rRNA enthalten (Bailey *et al.*, 1995; Gargano *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998; Liao *et al.*, 1999). Vermutlich erreicht das virale Protein die chromosomale Fragilität durch Interaktion mit p53 und durch Modulation der Apoptose-unabhängigen Funktionen des Tumorsuppressorproteins, das dadurch die Chromosomen-Kondensation der vier transkriptionsaktiven Gene in der Metaphase verhindert (Levine, 1990). Es wurde spekuliert, daß die Bindung die Wechselwirkung von p53 mit Reparaturenzymen und verschiedenen Helikasen blockiert (Leveillard *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1995).

Diese Ergebnisse und Beobachtungen unterstreichen die Komplexität des E1B-54kDa-Proteins von Ad12, das im Zusammenwirken mit den E1A-Proteinen zur hohen Onkogenität des Virus in immunkompetenten Nagetieren beiträgt. Ein weiterer Unterschied in den Wirkungsmechanismen der Onkoproteine beider Serotypen, Ad5 und Ad12, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Während die SUMO-1-Modifikation von Ad5 E1B-55kDa eine entscheidende Rolle bei der E1A-gekoppelten Transformation übernimmt, konnte bewiesen werden, daß die beiden unvollständigen SUMO-1-Konsensusmotive am Aminoterminus von Ad12 E1B-54kDa keine transformationsrelevanten Funktionen einnehmen.

5.3 DIE SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON Ad5 E1B-55kDa

5.3.1 AKKUMULATION VON E1B-55kDa, p53 UND SUMO-1 IN SUBNUKLEÄREN STRUKTUREN

Während der Kernexport von E1B-55kDa über ein Leucin-reiches NES vermittelt wird, weisen die Daten dieser Arbeit darauf hin, daß für den Kernimport des Ad5-Proteins die kovalente Verknüpfung mit SUMO-1 notwendig ist (Abb 13). Allerdings konnte gezeigt werden, daß die nukleäre Lokalisation des viralen Proteins für eine effiziente Transformation oder Inhibition der p53-Transaktivierung nicht ausreicht (Abb. 15A und 18A), sondern eine intakte SUMO-1-

Akzeptorsequenz auch nach Kernimport des E1B-Proteins noch essentiell ist. Immunfluoreszenz-Experimente mit transformierten Zelllinien demonstrierten, daß durch Inhibition des nukleären Exports durch LMB oder durch Punktmutationen in der NES-Sequenz das E1B-55kDa Protein, nicht aber die E1B-K104R-Mutante, zusammen mit p53, SUMO-1 und PML in diskreten subnukleären Proteinkomplexen akkumulierte (Abb. 20, 21, 22). Dies weist auf eine zusätzliche Funktion von SUMO-1 bei der intranukleären Steuerung von Proteinen zu den PODs hin (s. 5.3.2). Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß die subzelluläre Lokalisation alternativ oder zusätzlich durch Wechselwirkung mit zellulären Komponenten der nukleären Proteinkomplexe vermittelt wird. Unwahrscheinlich ist eine Beteiligung von PML oder p53, da trotz mehrmaliger Versuche während dieser Arbeit keine Interaktion zwischen E1B-55kDa und PML nachgewiesen werden konnte und E1B auch in p53-negativen Zellen mit den PODs assoziiert. Außerdem würde das virale Protein dann trotz Mutation der SUMO-1-Akzeptorsequenz mit den PODs kolokalisieren.

Für eine aktive Rolle bei der intranukleären Steuerung von E1B-55kDa durch SUMO-1 spricht zudem die Tatsache, daß das virale Protein in AB120-Zellen durch Überexpression von Epitop-markiertem SUMO-1 in punktförmigen oder fadenförmigen Strukturen im Zellkern zusammen mit dem überexprimierten Protein und PML sequestriert wird (Abb. 10B und 22).

Interessant ist allerdings die Beobachtung, daß E1B-K104R in LMB-behandelten AB19-Zellen fast ausschließlich im Zytoplasma zu beobachten ist, während die E1B-K104R-NES-Doppelmutante auch partiell im Kern lokalisiert (Abb. 20 j und m). Vermutlich gelangt nach mehrmaliger Passagierung der Zelllinie ein Teil der E1B-Proteine unspezifisch in den Kern, kann aber aufgrund der NES-Mutation nicht mehr hinaus transportiert werden. Falls SUMO-1 ausschließlich für die intranukleäre Steuerung und/oder Retention an den PODs verantwortlich ist, könnte es auch sein, daß die K104R-Mutante ersatzweise durch einen anderen, NES-abhängigen, aber LMB-unsensitiven Exportfaktor wie z.B. Calreticulin, exportiert wird (Holaska *et al.*, 2001).

Zahlreiche Hinweise, wie z.B., die Assoziation des E1B-Proteins während der viralen Replikation mit den PODs (Doucas *et al.*, 1996), der Rolle von SUMO-1 bei der Bildung der PODs (Duprez *et al.*, 1999; Everett *et al.*, 1999; Ishov *et al.*, 1999; Kamitani *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2000; Muller *et al.*, 1998; Seeler und Dejean, 2001; Sternsdorf *et al.*, 1997; Zhong *et al.*, 2000), die Kolokalisation des Markerproteins PML mit dem viralen Protein in den beobachteten Proteinkomplexen in den Zelllinien (Abb. 21), und die morphologische Ähnlichkeit der nukleären Strukturen mit den PODs, lassen vermuten, daß es sich hier tatsächlich um PML *oncogenic domains* handelt.

5.3.2 BEDEUTUNG DER POD-LOKALISATION VON AD5 E1B-55kDa BEI DER TRANSFORMATION

5.3.2.1 PODs—subnukleäre Proteinkomplexe

PODs (auch als ND10, Kr *bodies*, oder *nuclear bodies* bezeichnet) sind subnukleäre Strukturen, die bei Patienten mit primärer Gallenblasenzirrhose als Ziele von Autoantikörpern gegen das Sp100-Protein entdeckt wurden (zur Übersicht: Ascoli und Maul, 1991; Dyck *et al.*, 1994; Hatta und Fukamizu, 2001; Matera, 1999; Maul *et al.*, 2000; Mu *et al.*, 1994; Mu *et al.*, 1996; Seeler und Dejean, 1999; Sternsdorf *et al.*, 1997). Diese teilweise dynamischen Proteinkomplexe kommen in fast allen untersuchten Säugerzelllinien vor, wobei die Größe und Anzahl (in normalen Zellen 10–40/Zellkern mit einem Durchmesser von etwa 0,5 µm) durch Stimulation (Interferone), virale Infektionen oder durch Immortalisierung beeinflusst werden kann (Muratani *et al.*, 2001; Regad und Chelbi-Alix, 2001). Der am meisten charakterisierte POD-assoziierte Faktor ist das namensgebende Markerprotein PML (*promyelocytic leukemia-protein*). Es gehört zur Familie der RING-Finger Proteine, die sich durch die Anwesenheit eines RBCC-Motivs auszeichnen (*RING-B-box-coiled-coil*), welche Protein-Protein-Interaktionen aufgrund dreier Zink-Finger-ähnlichen Domänen vermitteln.

Als Ursache der akuten promyelozytischen Leukämie (APL) wurde eine Chromosomentranslokation, t(15/17), entdeckt, durch die das PML-Protein mit dem Retinolsäure- α -Rezeptor fusioniert wird und wodurch es zur vollständigen Auflösung der PODs kommt. Die therapeutische Behandlung der Tumor-erkrankten Patienten mit definierten Dosen von Retinolsäure führt zur klinischen Remission des Krankheitsbildes, was sich auf molekularer Ebene durch die Reassoziierung der PODs nachvollziehen läßt.

Interessanterweise sind viele der POD-assoziierten Proteine, aber vor allem die beiden Markerproteine PML und Sp100, Substratproteine der SUMO-1-Konjugation. Es konnte gezeigt werden, daß die SUMO-1-Modifikation von PML, welches sogar drei Akzeptorregionen besitzt, entscheidend für die Bildung und Formierung der PODs bzw. für die Rekrutierung weiterer POD-assoziiierter Proteine ist (Ishov *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 2001; Zhong *et al.*, 2000). Allerdings scheint die SUMOylierung anderer zellulärer Proteine ebenfalls wichtig für die Steuerung in die PODs zu sein (Tab. 3). Die POD-Assoziation von SENP1, einer SUMO-1-spezifischen Protease, läßt vermuten, daß durch Konjugation und Dekonjugation von SUMO-1 die Dynamik der PODs bzw. die Assoziation und Deassoziierung der zellulären Proteine ermöglicht wird (Gong *et al.*, 2000).

Neben PML, Sp100 und SUMO-1 enthalten die PODs weitere zelluläre Proteine, wie z.B. p53, INT-6, CBP/p300, HAUSP, HSP70, Daxx, TIF1 α und pRB (zur Übersicht: Negorev und Maul, 2001). Aufgrund der unterschiedlichen Aufgaben der assoziierten Proteine wurden die PODs mit verschiedenen zellulären Funktionen in Verbindung gebracht. Wegen der Induzierbarkeit einiger POD-Proteine durch IFN α/β (Typ I) und IFN γ (Typ II) oder der Interaktion mit Mx1 vermutet man, daß die PODs eine Rolle bei der zellulären Verteidigung gegen zellschädigende Substanzen oder Viren spielen (Engelhardt *et al.*, 2001; Regad *et al.*, 2001). Die Wechselwirkung von PML mit Sp100, AP1 und CBP, oder die Anwesenheit von RNA-Polymerase II-Transkripten in den PODs legt auch eine Beteiligung bei der Transkriptionsregulation nahe (Doucas, 2000; Doucas *et al.*, 1999; LaMorte *et al.*, 1998; Seeler *et al.*, 1998; Vallian *et al.*, 1998). Einige kürzlich erschienene Publikationen und die Anwesenheit von HAUSP, einer Ubiquitin-spezifischen Protease, weisen auch auf eine Beteiligung der PODs am intranukleären Proteinabbau hin (Anton *et al.*, 1999; Chelbi-Alix und de The, 1999; Fabunmi *et al.*, 2001; Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2001; Mattsson *et al.*, 2001; Xirodimas *et al.*, 2001). In dieser Arbeitsgruppe konnte im Rahmen der Arbeiten von S. Rubenwolf im Einklang mit den Daten anderer Arbeitsgruppen gezeigt werden, daß in Ad5-transformierten Zellen p53 über das große E1B-Protein zu den PODs dirigiert wird, wo der proteolytische Abbau des Tumorsuppressorproteins durch E4orf6 eingeleitet wird (Lain *et al.*, 1999; Lain *et al.*, 1999; Querido *et al.*, 2001; Querido *et al.*, 2001; Rubenwolf, 1999).

Neben weiteren zum Teil noch unbekannten Faktoren lokalisieren vor allem eine Reihe von Zellzyklus- und Apoptose-Regulatoren wie z.B. das pRb-Protein in den PODs, die darauf hindeuten, daß die subnukleären Strukturen verschiedene Funktionen bei der Kontrolle von Zellteilung und Zelltod übernehmen. Vor allem PML wurde als Wachstums- und Transformations-Suppressorprotein identifiziert, das durch ektopische Überexpression die Caspase-unabhängige Apoptose auslösen kann (He *et al.*, 1997; Le *et al.*, 1998; Mu *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1998). Exogene zelluläre Signale (z.B. Zytokine) oder Streß-Situationen (z.B. virale Infektionen, DNA-Schäden) scheinen ebenfalls die Expression des PML-Gens und damit seine anti-tumorigenen und pro-apoptotischen Eigenschaften zu steigern.

5.3.2.2 PODs als Ziele viraler Proteine

Die Bedeutung der PODs für die virale Replikation von zahlreichen DNA-Viren, aber auch einiger RNA-Viren, wird offensichtlich, wenn man bedenkt, daß sich die Replikationszentren von z.B. SV40, Ad5, und HSV-1 in unmittelbarer Nähe zu den PODs befinden (zur Übersicht:

Maul, 1998) oder, daß die POD-assoziierten Proteine im Verlauf der Replikation durch virale Proteine vollkommen umorganisiert werden (Tab. 11; Regad und Chelbi-Alix, 2001). Einerseits ist es einleuchtend, daß die subnukleären Proteinkomplexe als Protein-Reservoir mit wichtigen zellulären Faktoren für die virale Replikation dienen. Andererseits werden durch die Umorganisation wahrscheinlich POD-vermittelte antivirale Schutzmechanismen ausgeschaltet.

Tab. 11: Umstrukturierung der PODs durch virale Proteine

PROTEIN	BESCHREIBUNG
E4orf3 (Ad)	Umstrukturierung der PODs (Carvalho <i>et al.</i> , 1995; Puvion-Dutilleul <i>et al.</i> , 1995; Puvion-Dutilleul <i>et al.</i> , 1999)
ICP0 (HSV-1)	Delokalisierung und Degradierung von PML und Sp100 (Chelbi-Alix und de The, 1999; Everett <i>et al.</i> , 1999; Everett <i>et al.</i> , 1997)
IE1B (HHV6) K8 (HHV8)	POD-Kondensation (Gravel <i>et al.</i> , 2002) Rekrutierung von p53 zu den PODs (Katano <i>et al.</i> , 2001)
IE1 (HCMV)	Umstrukturierung der PODs und Beeinflussung des SUMOylierungsgrads von PML (Ahn <i>et al.</i> , 1998; Muller und Dejean, 1999)
EBNA5 (EBV) BZLF1 (EBV)	Umstrukturierung der PODs (Bell <i>et al.</i> , 2000; Szekely <i>et al.</i> , 1996)
L2 (HPV/BPV)	Kolokalisierung mit den PODs und Rekrutierung von L1 (Day <i>et al.</i> , 1998)
L-HDAg (HDV)	Umstrukturierung der PODs (Bell <i>et al.</i> , 2000)
Tas (HFV)	Kolokalisierung mit den PODs (Regad <i>et al.</i> , 2001)
Tax (HTLV-1)	Delokalisierung von Int-6 ins Zytoplasma (Desbois <i>et al.</i> , 1996)
Z-Protein (LCMV)	Delokalisierung von PML ins Zytoplasma (Desbois <i>et al.</i> , 1996)

Bei Infektion mit Ad5 kommt es innerhalb weniger Stunden zu einer Umstrukturierung der PODs in fadenförmige, fibrilläre *Tracks*. Im Verlauf der Replikation werden dann viele POD-assoziierte Proteine, aber nicht PML, zu den adenoviralen Replikationszentren rekrutiert. Zwar ist die Transfektion von Zellen mit einem Plasmid, das für das E4orf3-Protein kodiert, ausreichend, um diese Umorganisation der nukleären Proteinkomplexe zu beobachten, aber die POD-Assoziation weiterer adenoviraler Proteine bei der Replikation, wie z.B. E4orf6, E1A und E1B-55kDa, läßt vermuten, daß auch sie dabei im Viruskontext eine wichtige Rolle spielen (Carvalho *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996).

Obwohl E4orf3 keinen direkten Einfluß auf die SUMO-1-Konjugation von exogen transfiziertem PML hat (Muller und Dejean, 1999), kommt es während der Replikation zum vollständigen Verlust der SUMOylierung des Tumorsuppressorproteins, was ebenfalls auf eine aktive Rolle weiterer adenoviraler Proteine hindeutet (Everett *et al.*, 1999; Leppard und Everett, 1999).

Interessanterweise konnten einige der frühen viralen Genprodukte, die bei der Umorganisation der PODs beteiligt sind, auch als Substratproteine der SUMO-1-Konjugation identifiziert werden (Tab. 11 und 4). Außerdem scheinen die modifizierten Proteine wie z.B. das BZLF-1-Protein von EBV oder das IE1-Protein von HCMV den SUMOylierungsgrad von PML zu verringern und somit die PML-induzierte POD-Assoziation zu verhindern (Tab. 11).

Das ICP0-Protein von HSV-1 ist sogar in der Lage, als RING-Finger-Potein mit E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität, die beiden Markerproteine PML und Sp100 dem proteolytischen Abbau zuzuführen. Dies ist vermutlich die Ursache dafür, daß bereits 2 h nach Infektion die POD-Strukturen vollständig aufgelöst werden (zum Überblick: Everett, 2001). Andere Viren hingegen scheinen die Struktur der PODs nicht zu zerstören, sondern für ihre Zwecke zu nutzen. Während das IE1B-Protein von HHV-6 eine Kondensation der PODs bewirkt, ist das K8-Protein von HHV-8 in der Lage, im Kontext der PODs das Tumorsuppressorprotein zu rekrutieren und dort seine Funktionen zu modulieren (Tab. 11). Ebenso konnte für das L2-Protein von HPV oder BPV bisher nur die POD-Assoziation und Rekrutierung eines weiteren viralen Proteins beobachtet werden.

Auch bei den RNA-Viren bilden die PODs wichtige Zielstrukturen bei der Replikation. Tax von HTLV-1 oder das Z-Protein von LCMV induzieren eine räumliche Umverteilung der PODs durch die Delokalisierung von Int-6 oder PML ins Zytoplasma (Tab. 11). Beim Hepatitis-Delta-Virus (HDV) vermutet man, daß die L-HDAg-induzierte Umstrukturierung der PODs notwendig ist für die Regulierung der viralen RNA-Synthese. Die Repression der HFV- (*human foamy virus*) Transkription, welche *in vivo* durch das Tas-Protein aufgehoben wird, spricht für eine Beteiligung der PODs an interferoninduzierten zellulären Schutzmechanismen, da die Interferon-Produktion der Zelle durch virale Infektionen induziert wird (Tab. 11).

Aufgrund der Tatsache, daß sowohl zahlreiche zelluläre Tumorsuppressorproteine als auch verschiedene virale Proteine transient oder permanent in den PODs lokalisieren und die Beteiligung der PODs bei einer Tumorerkrankung (APL), erhärtet den Verdacht, daß diese auch bei der virusinduzierten Transformation eine entscheidende Rolle spielen.

5.3.2.3 Potentielle Rolle von PML bei der Ad E1-vermittelten Transformation

Neueste Untersuchungen zur POD-Funktion demonstrierten, daß PML mit dem Tumorsuppressorprotein p53 interagieren kann und es *in vivo* zu den PODs rekrutiert (Fogal *et al.*, 2000; Gottifredi und Prives, 2001; Guo *et al.*, 2000; Pearson und Pelicci, 2001). Es wurde gezeigt, daß PML notwendig ist für die streßinduzierte Aktivierung von p53 zur Transaktivierung von Genen, die an der Zellwachstums-Kontrolle und Apoptose beteiligt sind (Burns und El-Deiry, 1999). Der zugrunde liegende Mechanismus scheint nicht nur die Wechselwirkung zwischen p53 und der Spleißvariante PML3 zu sein (Jensen *et al.*, 2001), sondern auch die Modulation der p53-Aktivität. Es ist bekannt, daß die Stabilisierung und Steigerung der spezifischen DNA-Bindungsaktivität des Tumorsuppressorproteins durch posttranslationale Modifikation wie z.B. Phosphorylierung oder Acetylierung vermittelt wird (Giaccia und Kastan, 1998). Neuesten Daten zufolge hat PML eine aktive Rolle bei der Kontrolle der p53-abhängigen Reaktion der Zelle auf onkogene Signale, indem es die Acetylierung des 53kDa-Proteins durch Rekrutierung der Acetyltransferase CBP (oder auch PCAF?) zu den PODs induziert (Boisvert *et al.*, 2001; Pearson *et al.*, 2000; von Mikecz *et al.*, 2000). Ob auch die SUMO-1-Modifikation von p53 eine transkriptionsaktivierende Funktion *in vivo* hat, ist noch nicht vollständig geklärt (Gostissa *et al.*, 1999; Kahyo *et al.*, 2001; Kwek *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 1999; Schmidt und Muller, 2002).

Weitere Untersuchungen der PODs ergaben, daß in „normalen“ Zellen, die nicht durch Streßsignale induziert wurden, PML als Transkriptionsrepressor durch die Rekrutierung von Histon-Deacetylasen (HDACs) wirkt (Wu *et al.*, 2001). Aus diesem Grund ist man der Überzeugung, daß die Kolokalisation von PML mit Koaktivatoren oder Korepressoren der Transkription vom Zelltyp und von der physiologischen Kondition der Zelle abhängt. SUMO-1 scheint hierbei eine aktive Rolle in der Dynamik der POD-Formierung zu besitzen.

Kürzlich wurde demonstriert, daß Ad2 E1B-55kDa mit dem Transkriptionsrepressor HDAC1 und dem Korepressor mSin3A in Ad-transformierten und infizierten Zellen interagiert (s. 1.2.3.3; Punga und Akusjarvi, 2000). Der HDAC1/mSin3A-Komplex wird von vielen Transkriptionsrepressoren verwendet (Knoepfler und Eisenman, 1999). Von Liu *et al.* wurde ein anderer Mechanismus postuliert. Durch die Wechselwirkung von Ad2 E1B-55kDa oder Ad12 E1B-55kDa mit p53 und der Acetyltransferase PCAF wird die streßinduzierte Acetylierung des Tumorsuppressorproteins und somit die Transaktivierung von Genen, die das Zellwachstum und die Apoptose regulieren, verhindert (Liu *et al.*, 2000). Da auch die beiden Acetyltransferasen CBP und p300 Kandidaten für die Acetylierung des Tumorsuppressorproteins sind, schließen die Autoren nicht aus, daß auch diese durch das

virale Protein davon abgehalten werden, p53 zu modifizieren. Im Fall des viralen Onkoprotein Tax von HTLV-1 wurde bereits demonstriert, daß die CBP-abhängige Modifizierung und Aktivierung von p53 durch Wechselwirkung des retroviralen Pendelproteins mit der Acetyltransferase verhindert wird (Ariumi *et al.*, 2000).

Da PML das CBP-Protein nach Streßinduktion zu den PODs rekrutiert und der trimäre Komplex aus CBP, PML und p53 die Acetylierung des 53kDa-Proteins und somit seine Aktivierung einleitet, verdichten sich die Hinweise, daß die E1B-vermittelte Repression der p53-stimulierten Transkription in den nukleären Domänen stattfindet (Pearson *et al.*, 2000).

Die Kolokalisation des viralen Onkoproteins bei Inhibition des nukleären Exports zusammen mit p53, PML und SUMO-1 in subnukleären runden Domänen legt den Verdacht nahe, daß die direkte oder indirekte Interaktion mit PML und weiteren POD-assoziierten Faktoren wie z.B. HATs oder HDACs essentiell für die Inhibition der antiviralen Aktivität von p53 sind. Außerdem ist die SUMO-1-gesteuerte transiente Lokalisation in den PODs für die E1A-gekoppelte Transformation höchstwahrscheinlich essentiell.

5.4 MODELLVORSTELLUNG

Aufgrund der vorliegenden Daten läßt sich ein theoretisches Modell für die Strategien und Mechanismen von Ad5 E1B-55kDa bei der Transformation von Nagetierzellen in Kooperation mit den E1A-Proteinen aufstellen.

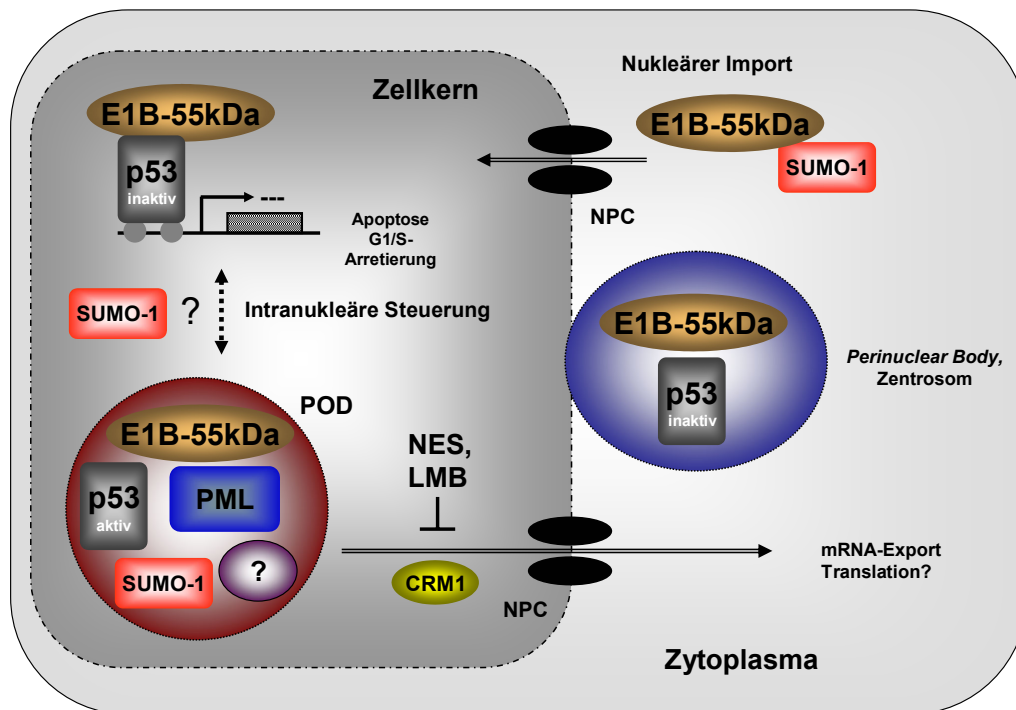


Abb. 24: Modellvorstellung für den Mechanismus des E1B-55kDa-Proteins von Ad5 bei der Transformation. Nähere Details im Text. NES: nukleäres Exportsignal, LMB: Leptomycin B, NPC: *nuclear pore complex*, POD: *PML oncogenic domain*.

In Rattenzelllinien, die stabil E1A und E1B-55kDa exprimieren, befindet sich das große E1B-Protein hauptsächlich im Zytoplasma, wo es zusammen mit dem Tumorsuppressorprotein p53 in einem kernangrenzenden Proteinkomplex, der als *Perinuclear Body* bezeichnet wird, akkumuliert. Aufgrund der Kolo-kalisation mit Perizentrin wurde spekuliert, daß es sich hier um das Zentrosom handelt (Brown *et al.*, 1994). Es ist zwar bekannt, daß die Hauptfunktion des viralen Onkoproteins bei der E1A-gekoppelten Transformation die Inhibition der antiviralen und proapoptotischen Eigenschaften des Tumorsuppressorprotein ist. Einige Argumente sprechen aber gegen eine Inaktivierung von p53 durch den E1B-vermittelten Transport ins Zytoplasma (s. 1.2.3.3). Vielmehr wurde gezeigt, daß das große E1B-Protein durch die direkte Bindung an p53 und durch aktive Inhibition der p53-abhängigen

Transaktivierung zur Transformation von Nagetierzellen beiträgt. In Ad E1-transformierten Zellen pendelt das E1B-55kDa-Protein ständig zwischen Zytoplasma und Zellkern hin und her, wobei das Gleichgewicht auf der zytoplasmatischen Seite liegt. Im Kontext der adenoviralen Replikation trägt die Pendelaktivität wahrscheinlich zum Export und damit zur Translation viraler mRNA bei. Der Transport über die Kernporen ins Zytoplasma wird durch ein kürzlich identifiziertes Leucin-reiches, CRM1-abhängiges nukleäres Exportsignal vermittelt, und kann durch Punktmutationen in der NES-Sequenz oder durch Zugabe des CRM1-Inhibitors LMB verhindert werden. Infolgedessen wird das E1B-Protein in transformierten Zellen im Kern zurückgehalten, wo es zusammen mit p53, SUMO-1 und PML in den PODs sequestriert wird. Die posttranslationale Modifikation des viralen Onkoproteins mit SUMO-1 bewirkt den effizienten Kernimport und scheint darüber hinaus für die intranukleäre Lokalisation des Ad5-Proteins in den PODs verantwortlich zu sein, da das virale Protein bei mutierter SUMO-1-Akzeptorsequenz trotz Inhibition des Exports weder im Kern, noch in subnukleären Strukturen zu beobachten ist. Außerdem kann durch Überexpression von Epitop-markiertem SUMO-1 in Ad E1-transformierten Zellen das E1B-55kDa-Protein in den Kern in punkt- oder fadenförmige Strukturen dirigiert werden. Der effiziente Export des Ad5-Proteins aus dem Kern ins Zytoplasma impliziert nicht nur eine intakte NES-Sequenz, sondern auch eine Dekonjugation von SUMO-1, die vermutlich in den PODs durch SUMO-1-spezifische Isopeptidasen wie z.B. SENP1 vermittelt wird. (Gong *et al.*, 2000) Dafür spricht auch die Tatsache, daß NES und die SUMO-1-Konjugationsstelle im E1B-Protein eng benachbart sind. Vorstellbar ist eine Maskierung der NES-Sequenz durch SUMO-1, während die Abspaltung die Interaktion von NES mit CRM1 und damit den Export ermöglicht.

Die vorliegenden Beobachtungen lassen vermuten, daß die E1B-vermittelte Inaktivierung von p53 im Kontext der PODs stattfindet, da eine SUMO-defiziente E1B-Mutante weder in der Lage ist, die Transkriptionsaktivierung des Tumorsuppressorproteins effizient zu inhibieren, noch mit den PODs zu kolokalisieren. Ein NES-mutiertes E1B-Protein hingegen weist im Vergleich zum WT-Protein ein um ein Vielfaches gesteigertes inhibitorisches Potential auf, was sich durch die Retention in den PODs erklären läßt.

Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die transiente POD-Lokalisation während der nukleozytoplasmatischen Pendelaktivität des E1B-55kDa-Proteins essentiell für die Inaktivierung von p53 und somit für die Transformation von nicht-permissiven Zellen ist.

5.5 AUSBLICK

Auf der Grundlage der bisher erarbeiteten Daten ist es möglich, das Verständnis der transformierenden Aktivitäten des E1B-55kDa-Onkoproteins zu erweitern. Es konnte erstmals gezeigt werden, daß SUMO-1 eine essentielle Rolle bei der E1A/E1B-vermittelten Transformation spielt. Da in der Vergangenheit auch den beiden viralen Genprodukten E4orf3 und E4orf6 transformierende und onkogene Eigenschaften zugeschrieben wurden (Nevels *et al.*, 2000; Nevels *et al.*, 1999; Nevels *et al.*, 1999), ist das Ziel, durch weitere Experimente das komplexe Zusammenwirken von E1B-55kDa, E4orf3 und E4orf6 im Kontext der Ad5-vermittelten Transformation aufzuklären. In diesem Zusammenhang muß geklärt werden, welchen Einfluß die beiden E4-Proteine auf die SUMO-1-Modifikation und die subzelluläre Lokalisation des E1B-Proteins haben. Außerdem scheint nicht nur die Inaktivierung von p53, sondern auch seine Destabilisierung im Kontext der PODs durch die E3-Ubiquitin-Ligaseaktivität von E4orf6 zu erfolgen (Lain *et al.*, 1999; Lain *et al.*, 1999; Querido *et al.*, 2001; Querido *et al.*, 2001; Rubenwolf, 1999). Hierbei ist auch die Rolle von E1B-55kDa und SUMO-1 von Interesse. Im Mittelpunkt weiterer Untersuchungen steht generell die Funktion der PODs oder verschiedener POD-assoziiierter Proteine, und ihre Rolle bei der Inaktivierung des Tumorsuppressorproteins p53. Neben der SUMO-1-Konjugation des großen E1B-Proteins von Ad5 wurde auch die Modifikation durch SUMO-2 und -3, über deren Funktion man noch sehr wenig weiß, experimentell gezeigt. Weitere Analysen sollen die Rolle dieser Modifikationen *in vivo* aufklären. Um einen Einblick in die Regulation der SUMO-1-Konjugation des E1B-Proteins zu erhalten, sollten durch Mutationsanalysen jene Bereiche identifiziert werden, die für die Wechselwirkung mit Komponenten der SUMO-1-Konjugationsmaschinerie verantwortlich sind. Dazu zählen neben Ubc9 auch einige kürzlich identifizierte E3-SUMO-1-Ligasen, welche eventuell ebenfalls bei der SUMOylierung von Ad5 E1B-55kDa *in vivo* eine Rolle spielen (Hochstrasser, 2001; Kahyo *et al.*, 2001; Pichler *et al.*, 2002; Sachdev *et al.*, 2001; Schmidt und Muller, 2002). Für das Verständnis der Funktion der SUMOylierung des viralen Proteins ist ebenso die Dekonjugation bzw. die Rolle der verschiedenen SUMO-1-spezifischen Isopeptidasen einschließlich des POD-assoziierten SENP1-Proteins, oder der Ad-kodierten Protease L3, welche starke Homologien zu den bekannten SUMO-Proteasen aufweist, von Interesse (Gong *et al.*, 2000; Li und Hochstrasser, 1999).

Die transformierenden Eigenschaften des Ad12 E1B-54kDa-Proteins überlappen zwar nur teilweise mit denen von Ad5 E1B-55kDa, trotzdem trägt auch die Inaktivierung von p53 zur

Transformation bei. Ob die Inhibition der p53-Transaktivierung trotz fehlender SUMO-1-Modifikation im Kontext der PODs oder mit Hilfe anderer POD-assoziiierter Proteine analog zu Ad5 stattfindet, bleibt Gegenstand weiterer Analysen.

Schließlich müssen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse in Bezug auf die Rolle der SUMO-1-Konjugation, der Pendelaktivität und der POD-Lokalisation von Ad5 E1B-55kDa bei der E1A/E1B-vermittelten Transformation auch auf die virale Replikation in permissiven Zellen ausgedehnt werden. Hierbei ist ebenfalls wieder die Inaktivierung der antiviralen Aktivitäten von p53 durch die E1B- und E4-Proteine und die Rolle von SUMO-1 von Interesse. In diesem Zusammenhang ist es dringend notwendig, die molekularen Mechanismen der onkolytischen Eigenschaften von ONYX-015, eines E1B-55kDa-negativen, aber selektiv-replikationskompetenten Ad5-Vektors, aufzuklären (Barker und Berk, 1987; Dix *et al.*, 2001; Ginsberg, 1996; Hitt *et al.*, 1997; Kirn, 2001; Nemunaitis *et al.*, 2001). Obwohl der adenovirale Vektor bereits in klinischen Studien der Phase II eingesetzt wird, ist die molekulare Grundlage für die nicht allgemeingültige tumorspezifische Replikationseffizienz der E1B-55kDa-defizienten Virusmutante immer noch unklar und wird kontrovers diskutiert (Alemany *et al.*, 2000; Dix *et al.*, 2001). Zur Gewährleistung einer effizienten Virusreplikation unter Ausschluß aller onkogenen Eigenschaften wäre eine Modulation des E1B-55kDa-Gens durch gezielte Mutagenese gegenüber ONYX-015 wahrscheinlich von Vorteil.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das 55-kDa Genprodukt der frühen Region 1B (E1B-55kDa) von Adenovirus Typ 5 (Ad5) ist ein multifunktionelles Polypeptid, das eine Schlüsselfunktion im produktiven Infektionszyklus und im Ad-induzierten Transformationsvorgang primärer Zellen einnimmt. Den onkogenen Aktivitäten des E1B-Proteins liegen verschiedene Wirkmechanismen zugrunde, die zumindest teilweise über die Modulation des Tumorsuppressorproteins p53 und anderen Regulatoren der Genexpression, Zellzykluskontrolle, Apoptose und DNA-Reparatur vermittelt werden. Als weitere Faktoren werden eine intrinsische Repressoraktivität und eine nukleozytoplasmatische Pendelfunktion vermutet, die durch ein nukleäres Exportsignal (NES) im aminoterminalen Teil des E1B-Proteins reguliert wird.

Auf der Grundlage dieser Beobachtungen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Bedeutung des Exportsignals und anderer Domänen für die transformierenden Eigenschaften des Ad5 E1B-55kDa-Proteins untersucht. Dazu wurden Aminosäureaustausche innerhalb der NES-Region und in benachbarte Bereiche des E1B-55kDa-Proteins eingeführt. Die E1B-Mutanten wurden dann zusammen mit E1A in klassischen Transformationsversuchen mit Nierenepithel-Zellen aus neugeborenen Ratten getestet. Die dabei erhaltenen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: Mutationen im E1B-NES verstärken die *Focus*-Bildung gegenüber dem WT-Protein, während Veränderungen im benachbarten Bereich an Aminosäureposition 103 und 104 zum vollständigen Verlust der kooperativen Eigenschaften des E1B-55kDa-Proteins führen. Datenbankanalysen zeigen, daß der dem NES folgende Abschnitt interessanterweise ein SUMO-Konjugationsmotiv enthält. Die Aminosäuresequenz, ψ K x E ist auch in den großen E1B-Proteinen der Serotypen 2, 7 und 9 konserviert. Dagegen fehlt die für die SUMO-1-Konjugation wichtige aliphatische Aminosäure vor dem Lysinrest (K) in den großen E1B-Proteinen von Ad12, Ad40 und Ad41. Funktionelle Analysen zeigen, daß Ad5 E1B-55kDa tatsächlich durch SUMO-1, SUMO-2 und SUMO-3 in kotransfizierten Zellen modifiziert wird und auch in virusinfizierten Zellen SUMO-1-konjugierte Formen des E1B-Proteins vorliegen. Aminosäureaustausche im SUMO-Konjugationsmotiv (V103D oder K104R) verhindern die kovalente Verknüpfung von SUMO-1, -2 und -3. Dies resultiert in einer ineffizienten Repression p53-stimulierter Transkription und geht einher mit dem vollständigen Verlust der transformierenden Aktivitäten des großen E1B-Proteins in Kombination mit E1A. Ad5 E1B-

55kDa ist somit das erste Beispiel eines viralen Onkoproteins, dessen transformierende Eigenschaften posttranslational durch SUMO-Modifikation reguliert werden.

Funktionelle und immunhistochemische Analysen zeigen, daß die Konjugation von SUMO-1 den effizienten Import des E1B-Proteins in den Zellkern vermittelt. Außerdem bewirkt die Überexpression von SUMO-1 in E1A/E1B-transformierten Zellen eine Umverteilung des E1B-Proteins aus dem Zytoplasma in nukleäre, punktförmige bzw. fibrilläre Strukturen. Da diese Strukturen auch SUMO-1 und PML enthalten, könnte die SUMOylierung des E1B-Proteins ebenso die intranukleäre Assoziation mit PODs steuern. Dieser Befund ist hoch interessant, da mittlerweile bekannt ist, daß die transkriptionsaktiven Funktionen von p53 über die Wechselwirkung mit dem POD-assoziierten Tumorsuppressorprotein PML in den PODs reguliert werden. Es besteht daher die Möglichkeit, daß die Inhibition von p53 durch E1B-55kDa in den PODs stattfindet und durch SUMO-1-Konjugation reguliert wird. Diese Annahme wird auch durch die Beobachtung unterstützt, daß Mutationen im E1B-NES die *Focus*-Bildung verstärken und die NES-Mutante im Zellkern in großen punktförmigen Strukturen lokalisiert, die p53 und PML enthalten.

Insgesamt zeigen die vorliegenden Daten erstmals, daß das transformierende Potential eines viralen Onkoproteins durch SUMO-1-Modifikation gesteuert wird. In einem einfachen Modell, reguliert die SUMOylierung den Kernimport und intranukleäre Verteilung des Ad5 E1B-55kDa-Proteins in PODs. Diese matrixassoziierten, subnukleären Strukturen repräsentieren vermutlich die Orte der Inhibition von p53 und darüber hinaus Kompartimente, welche den Export des Ad5 E1B-Proteins regulieren. Aufgrund dieser Beobachtungen ergeben sich neue experimentelle Ansatzmöglichkeiten, die langfristig einen detaillierten Einblick in molekulare Mechanismen der Tumorentstehung ermöglichen und gleichzeitig das Verständnis über die Rolle von PODs und POD-assoziierten Proteinen in der Regulation der zellulären Wachstumskontrollmechanismen erweitern.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Adamson, A. L., and Kenney, S.** (2001). Epstein-barr virus immediate-early protein BZLF1 is SUMO-1 modified and disrupts promyelocytic leukemia bodies. *J Virol* 75, 2388-99.
- Ahn, J. H., Brignole, E. J., 3rd, and Hayward, G. S.** (1998). Disruption of PML subnuclear domains by the acidic IE1 protein of human cytomegalovirus is mediated through interaction with PML and may modulate a RING finger-dependent cryptic transactivator function of PML. *Mol Cell Biol* 18, 4899-913.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D.** (1995). *Krebs. Molekularbiologie der Zelle*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 24, 1489-35.
- Aleman, R., Balague, C., and Curiel, D. T.** (2000). Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol* 18, 723-27.
- Ali, S. H., and DeCaprio, J. A.** (2001). Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. *Semin Cancer Biol* 11, 15-23.
- Ankerst, J., and Jonsson, N.** (1989). Adenovirus type 9-induced tumorigenesis in the rat mammary gland related to sex hormonal state. *J Natl Cancer Inst* 81, 294-98.
- Ankerst, J., Jonsson, N., Kjellen, L., Norrby, E., and Sjogren, H. O.** (1974). Induction of mammary fibroadenomas in rats by adenovirus type 9. *Int. J. Cancer* 13, 286-90.
- Anton, L. C., Schubert, U., Bacik, I., Princiotta, M. F., Wearsch, P. A., Gibbs, J., Day, P. M., Realini, C., Rechsteiner, M. C., Bennink, J. R., and Yewdell, J. W.** (1999). Intracellular localization of proteasomal degradation of a viral antigen. *J Cell Biol* 146, 113-24.
- Ariumi, Y., Kaida, A., Lin, J. Y., Hirota, M., Masui, O., Yamaoka, S., Taya, Y., and Shimotohno, K.** (2000). HTLV-1 tax oncoprotein represses the p53-mediated trans-activation function through coactivator CBP sequestration. *Oncogene* 19, 1491-99.
- Ascoli, C. A., and Maul, G. G.** (1991). Identification of a novel nuclear domain. *J Cell Biol* 112, 785-95.
- Babiss, L. E., Ginsberg, H. S., and Darnell, J. E., 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, 2552-58.
- Bachi, A., Braun, I. C., Rodrigues, J. P., Pante, N., Ribbeck, K., von Kobbe, C., Kutay, U., Wilm, M., Gorlich, D., Carmo-Fonseca, M., and Izaurralde, E.** (2000). The C-terminal domain of TAP interacts with the nuclear pore complex and promotes export of specific CTE-bearing RNA substrates. *RNA* 6, 136-58.
- Bailey, A. D., Li, Z., Pavelitz, T., and Weiner, A. M.** (1995). Adenovirus type 12-induced fragility of the human RNU2 locus requires U2 small nuclear RNA transcriptional regulatory elements. *Mol Cell Biol* 15, 6246-55.
- Balint, E. E., and Vousden, K. H.** (2001). Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *Br J Cancer* 85, 1813-23.
- Barker, D. D., and Berk, A. J.** (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.
- Bates, S., Phillips, A. C., Clark, P. A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R. L., and Vousden, K. H.** (1998). p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 395, 124-25.
- Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R., and Becker, J.** (1998). Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* 280, 275-86.
- Beck, K. F., Stathopoulos, I., Berninger, M. G., and Schweizer, M.** (1993). Overcoming GC compression in nucleotide sequencing. *Biotechniques* 14, 375.
- Bell, P., Brazas, R., Ganem, D., and Maul, G. G.** (2000). Hepatitis delta virus replication generates complexes of large hepatitis delta antigen and antigenomic RNA that affiliate with and alter nuclear domain 10. *J Virol* 74, 5329-36.
- Bell, P., Lieberman, P. M., and Maul, G. G.** (2000). Lytic but not latent replication of epstein-barr virus is associated with PML and induces sequential release of nuclear domain 10 proteins. *J Virol* 74, 11800-10.
- Bellgrau, D., Walker, T. A., and Cook, J. L.** (1988). Recognition of adenovirus E1A gene products on immortalized cell surfaces by cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 62, 1513-19.
- Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L., and Finberg, R. W.** (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275, 1320-23.
- Bernards, R., Schrier, P. I., Houweling, A., Bos, J. L., van der Eb, A. J., Zijlstra, M., Melief, C. J.** (1983). Tumorigenicity of cells transformed by adenovirus type 12 by evasion of T-cell immunity. *Nature* 305, 776-79.
- Bernards, R., and Van der Eb, A. J.** (1984). Adenovirus: transformation and oncogenicity. *Biochim Biophys Acta* 783, 187-204.

- Bhaskar, V., Smith, M., and Courey, A. J.** (2002). Conjugation of Smt3 to dorsal may potentiate the *Drosophila* immune response. *Mol Cell Biol* 22, 492-504.
- Bies, J., Markus, J., and Wolff, L.** (2002). Covalent attachment of SUMO-1 protein to the negative regulatory domain of the c-Myb transcription factor modifies its stability and transactivation capacity. *J Biol Chem* 277, 8999-9009.
- Black, A. R., and Azizkhan-Clifford, J.** (1999). Regulation of E2F: a family of transcription factors involved in proliferation control. *Gene* 237, 281-302.
- Blair Zajdel, M. E., and Blair, G. E.** (1988). The intracellular distribution of the transformation-associated protein p53 in adenovirus-transformed rodent cells. *Oncogene* 2, 579-84.
- Boisvert, F. M., Kruhlak, M. J., Box, A. K., Hendzel, M. J., and Bazett-Jones, D. P.** (2001). The transcription coactivator CBP is a dynamic component of the promyelocytic leukemia nuclear body. *J Cell Biol* 152, 1099-106.
- Boyer, J. L., and Ketner, G.** (2000). Genetic analysis of a potential zinc-binding domain of the adenovirus E4 34k protein. *J Biol Chem* 275, 14969-78.
- Boyle, J. S., and Lew, A. M.** (1995). An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet* 11, 8.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
- Braithwaite, A. W., and Russell, I. A.** (2001). Induction of cell death by adenoviruses. *Apoptosis* 6, 359-70.
- Breckenridge, D. G., and Shore, G. C.** (2000). Regulation of apoptosis by E1A and Myc oncoproteins. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 10, 273-80.
- Brown, C. R., Doxsey, S. J., White, E., and Welch, W. J.** (1994). Both viral (adenovirus E1B) and cellular (hsp 70, p53) components interact with centrosomes. *J Cell Physiol* 160, 47-60.
- Burns, T. F., and El-Deiry, W. S.** (1999). The p53 pathway and apoptosis. *J Cell Physiol* 181, 231-39.
- Buschmann, T., Fuchs, S. Y., Lee, C. G., Pan, Z. Q., and Ronai, Z.** (2000). SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. *Cell* 101, 753-62.
- Buschmann, T., Lerner, D., Lee, C. G., and Ronai, Z.** (2001). The Mdm-2 amino terminus is required for Mdm2 binding and SUMO-1 conjugation by the E2 SUMO-1 conjugating enzyme Ubc9. *J Biol Chem* 276, 40389-95.
- Carvalho, T., Seeler, J. S., Ohman, K., Jordan, P., Pettersson, U., Akusjarvi, G., Carmo-Fonseca, M., and Dejean, A.** (1995). Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies. *J Cell Biol* 131, 45-56.
- Chakrabarti, S. R., and Nucifora, G.** (1999). The leukemia-associated gene TEL encodes a transcription repressor which associates with SMRT and mSin3A. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 871-77.
- Chakrabarti, S. R., Sood, R., Nandi, S., and Nucifora, G.** (2000). Posttranslational modification of TEL and TEL/AML1 by SUMO-1 and cell-cycle-dependent assembly into nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13281-85.
- Chauvin, C., Suh, M., Remy, C., and Benabid, A. L.** (1990). Failure to detect viral genomic sequences of three viruses (herpes simplex, simian virus 40 and adenovirus) in human and rat brain tumors. *Ital J Neurol Sci* 11, 347-57.
- Chelbi-Alix, M. K., and de The, H.** (1999). Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins. *Oncogene* 18, 935-41.
- Chellappan, S., Kraus, V. B., Kroger, B., Munger, K., Howley, P. M., Phelps, W. C., and Nevins, J. R.** (1992). Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4549-53.
- Chin, L., Pomerantz, J., and DePinho, R. A.** (1998). The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene--two products--two pathways. *Trends Biochem Sci* 23, 291-96.
- Chinnadurai, G.** (1998). Control of apoptosis by human adenovirus genes. *Semin Virol* 8, 399-408.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Lane, B. R., and Dixit, V. M.** (1997). Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* 275, 1122-26.
- Chiou, S. K., Rao, L., and White, E.** (1994). Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis [published erratum appears in *Mol Cell Biol* 1994 Jun;14(6):4333]. *Mol Cell Biol* 14, 2556-63.
- Ciechanover, A.** (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *Embo J* 17, 7151-60.
- Cook, J. L., Kirkpatrick, C. H., Rabson, A. S., and Lewis, A. M., Jr.** (1979). Rejection of adenovirus 2-transformed cell tumors and immune responsiveness in Syrian hamsters. *Cancer Res* 39, 4949-55.
- Cook, J. L., and Lewis, A. M., Jr.** (1979). Host response to adenovirus 2-transformed hamster embryo cells. *Cancer Res* 39, 1455-61.

- Cook, J. L., Walker, T. A., Lewis, A. M., Jr., Ruley, H. E., Graham, F. L., Pilder, S. H. (1986). Expression of the adenovirus E1A oncogene during cell transformation is sufficient to induce susceptibility to lysis by host inflammatory cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 6965-69.
- Cook, J. L., May, D. L., Lewis, A. M., Jr., Walker, T. A. (1987). Adenovirus E1A gene induction of susceptibility to lysis by natural killer cells and activated macrophages in infected rodent cells. *J Virol* 61, 3510-20.
- Csata, S., Kulcsar, G., Dan, P., Horvath, J., Nasz, I., Ongradi, J., and Verebelyi, A. (1982). Adenovirus antibodies in tumorous diseases of the urogenital system. *Acta Chir Acad Sci Hung* 23, 15-22.
- Csata, S., Kulcsar, G., Horvath, J., Nasz, I., Ongradi, J., and Verebelyi, A. (1982). Study of antibodies to adenoviruses in patients with tumors of the urogenital system. *Int Urol Nephrol* 14, 115-19.
- Daujat, S., Neel, H., and Piette, J. (2001). MDM2: life without p53. *Trends Genet* 17, 459-64.
- Day, P. M., Roden, R. B., Lowy, D. R., and Schiller, J. T. (1998). The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol* 72, 142-50.
- Debbas, M., and White, E. (1993). Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev* 7, 546-54.
- DeGregori, J., Leone, G., Miron, A., Jakoi, L., and Nevins, J. R. (1997). Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7245-50.
- Dell, G., and Gaston, K. (2001). Human papillomaviruses and their role in cervical cancer. *Cell Mol Life Sci* 58, 1923-42.
- Desbois, C., Rousset, R., Bantignies, F., and Jalinot, P. (1996). Exclusion of Int-6 from PML nuclear bodies by binding to the HTLV-I Tax oncoprotein. *Science* 273, 951-53.
- Desterro, J. M., Rodriguez, M. S., and Hay, R. T. (1998). SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell* 2, 233-39.
- Dix, B. R., Edwards, S. J., and Braithwaite, A. W. (2001). Does the antitumor adenovirus ONYX-015/dl1520 selectively target cells defective in the p53 pathway? *J Virol* 75, 5443-47.
- Dobbelstein, M., Roth, J., Kimberly, W. T., Levine, A. J., and Shenk, T. (1997). Nuclear export of the E1B 55-kDa and E4 34-kDa adenoviral oncoproteins mediated by a rev-like signal sequence. *Embo J* 16, 4276-84.
- Dobner, T., Horikoshi, N., Rubenwolf, S., and Shenk, T. (1996). Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor. *Science* 272, 1470-73.
- Dobner, T., and Kzhyshkowska, J. (2001). Nuclear export of adenovirus RNA. *Curr Top Microbiol Immunol* 259, 25-54.
- Doerfler, W. (1996). A new concept in (adenoviral) oncogenesis: integration of foreign DNA and its consequences. *Biochim Biophys Acta* 1288, F79-99.
- Doerfler, W., Hohlweg, U., Muller, K., Remus, R., Heller, H., and Hertz, J. (2001). Foreign DNA integration-perturbations of the genome-oncogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 945, 276-88.
- Dolph, P. J., Racaniello, V., Villamarin, A., Palladino, F., and Schneider, R. J. (1988). The adenovirus tripartite leader may eliminate the requirement for cap-binding protein complex during translation initiation. *J Virol* 62, 2059-66.
- Doniger, J., Muralidhar, S., and Rosenthal, L. J. (1999). Human cytomegalovirus and human herpesvirus 6 genes that transform and transactivate. *Clin Microbiol Rev* 12, 367-82.
- Dosch, T., Horn, F., Schneider, G., Krätzer, F., Dobner, T., Hauber, J., and Stauber, R. H. (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.
- Doucas, V. (2000). The promyelocytic (PML) nuclear compartment and transcription control. *Biochem Pharmacol* 60, 1197-201.
- Doucas, V., Ishov, A. M., Romo, A., Juguilon, H., Weitzman, M. D., Evans, R. M., and Maul, G. G. (1996). Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure. *Genes Dev* 10, 196-207.
- Doucas, V., Tini, M., Egan, D. A., and Evans, R. M. (1999). Modulation of CREB binding protein function by the promyelocytic (PML) oncoprotein suggests a role for nuclear bodies in hormone signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2627-32.
- Dulbecco, R. a. F., G. (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology* 8, 396-97.
- Duprez, E., Saurin, A. J., Desterro, J. M., Lallemand-Breitenbach, V., Howe, K., Boddy, M. N., Solomon, E., de The, H., Hay, R. T., and Freemont, P. S. (1999). SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *J Cell Sci* 112, 381-93.
- Dyck, J. A., Maul, G. G., Miller, W. H., Jr., Chen, J. D., Kakizuka, A., and Evans, R. M. (1994). A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell* 76, 333-43.

- Elfgang, C., Rosorius, O., Hofer, L., Jaksche, H., Hauber, J., and Bevec, D. (1999). Evidence for specific nucleocytoplasmic transport pathways used by leucine-rich nuclear export signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6229-34.
- Engelhardt, O. G., Ullrich, E., Kochs, G., and Haller, O. (2001). Interferon-induced antiviral Mx1 GTPase is associated with components of the SUMO-1 system and promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Exp Cell Res* 271, 286-95.
- Everett, R. D. (2001). DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies. *Oncogene* 20, 7266-73.
- Everett, R. D., Lomonte, P., Sternsdorf, T., van Driel, R., and Orr, A. (1999). Cell cycle regulation of PML modification and ND10 composition. *J Cell Sci* 112, 4581-88.
- Everett, R. D., Meredith, M., and Orr, A. (1999). The ability of herpes simplex virus type 1 immediate-early protein Vmw110 to bind to a ubiquitin-specific protease contributes to its roles in the activation of gene expression and stimulation of virus replication. *J Virol* 73, 417-26.
- Everett, R. D., Meredith, M., Orr, A., Cross, A., Kathoria, M., and Parkinson, J. (1997). A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein. *Embo J* 16, 1519-30.
- Fabunmi, R. P., Wigley, W. C., Thomas, P. J., and DeMartino, G. N. (2001). Interferon gamma regulates accumulation of the proteasome activator PA28 and immunoproteasomes at nuclear PML bodies. *J Cell Sci* 114, 29-36.
- Fang, S., Jensen, J. P., Ludwig, R. L., Vousden, K. H., and Weissman, A. M. (2000). Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem* 275, 8945-51.
- Flint, S. J., Sambrook, J., Williams, J. F., and Sharp, P. A. (1976). Viral nucleic acid sequences in transformed cells. IV. A study of the sequences of adenovirus 5 DNA and RNA in four lines of adenovirus 5-transformed rodent cells using specific fragments of the viral genome. *Virology* 72, 456-70.
- Fogal, V., Gostissa, M., Sandy, P., Zacchi, P., Sternsdorf, T., Jensen, K., Pandolfi, P. P., Will, H., Schneider, C., and Del Sal, G. (2000). Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *Embo J* 19, 6185-95.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, I. W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90, 1051-60.
- Freedman, D. A., and Levine, A. J. (1998). Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Mol Cell Biol* 18, 7288-93.
- Freedman, D. A., and Levine, A. J. (1999). Regulation of the p53 protein by the MDM2 oncoprotein-thirty-eighth G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 59, 1-7.
- Freedman, D. A., Wu, L., and Levine, A. J. (1999). Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci* 55, 96-107.
- Fries, K. L., Miller, W. E., and Raab-Traub, N. (1996). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 blocks p53-mediated apoptosis through the induction of the A20 gene. *J Virol* 70, 8653-59.
- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M., and Nishida, E. (1997). CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* 390, 308-11.
- Gabler, S., Schutt, H., Groitl, P., Wolf, H., Shenk, T., and 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.
- Gallimore, P. H. (1974). Viral DNA in transformed cells. II. A study of the sequences of adenovirus 2 DNA in nine lines of transformed rat cells using specific fragments of the viral genome. *J Mol Biol* 89, 49-72.
- Gallimore, P. H., Byrd, P. J., Whittaker, J. L., and Grand, R. J. (1985). Properties of rat cells transformed by DNA plasmids containing adenovirus type 12 E1 DNA or specific fragments of the E1 region: comparison of transforming frequencies. *Cancer Res* 45, 2670-80.
- Gallimore, P. H., Lecane, P. S., Roberts, S., Rookes, S. M., Grand, R. J., and Parkhill, J. (1997). Adenovirus type 12 early region 1B 54K protein significantly extends the life span of normal mammalian cells in culture. *J Virol* 71, 6629-40.
- Gallimore, P. H., and Turnell, A. S. (2001). Adenovirus E1A: remodelling the host cell, a life or death experience. *Oncogene* 20, 7824-35.
- Gargano, S., Wang, P., Rusanganwa, E., and Bacchetti, S. (1995). The transcriptionally competent U2 gene is necessary and sufficient for adenovirus type 12 induction of the fragile site at 17q21-22. *Mol Cell Biol* 15, 6256-61.
- Gerace, L. (1995). Nuclear export signals and the fast track to the cytoplasm. *Cell* 82, 341-44.
- Giaccia, A. J., and Kastan, M. B. (1998). The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 12, 2973-83.
- Ginsberg, H. S. (1996). The ups and downs of adenovirus vectors. *Bull N Y Acad Med* 73, 53-58.
- Giorgino, F., de Robertis, O., Laviola, L., Montrone, C., Perrini, S., McCowen, K. C., and Smith, R. J. (2000). The sentrin-conjugating enzyme mUbc9 interacts with GLUT4 and GLUT1 glucose transporters and regulates transporter levels in skeletal muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1125-30.

- Glaunsinger, B. A., Weiss, R. S., Lee, S. S., and Javier, R. (2001). Link of the unique oncogenic properties of adenovirus type 9 E4-ORF1 to a select interaction with the candidate tumor suppressor protein ZO-2. *Embo J* 20, 5578-86.
- Gong, L., Millas, S., Maul, G. G., and Yeh, E. T. (2000). Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin-specific protease. *J Biol Chem* 275, 3355-59.
- Gooding, L. R., Aquino, L., Duerksen Hughes, P. J., Day, D., Horton, T. M., Yei, S. P., and Wold, W. S. (1991). The E1B 19,000-molecular-weight protein of group C adenoviruses prevents tumor necrosis factor cytotoxicity of human cells but not of mouse cells. *J Virol* 65, 3083-94.
- Goodrum, F. D., and Ornelles, D. A. (1997). The early region 1B 55-kilodalton oncoprotein of adenovirus relieves growth restrictions imposed on viral replication by the cell cycle. *J Virol* 71, 548-61.
- Goodrum, F. D., and Ornelles, D. A. (1998). p53 status does not determine outcome of E1B 55-kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *J Virol* 72, 9479-90.
- Goodrum, F. D., Shenk, T., and Ornelles, D. A. (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.
- Görlich, D., and Kutay, U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 607-60.
- Görlich, D., and Mattaj, I. W. (1996). Nucleocytoplasmic transport. *Science* 271, 1513-18.
- Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S. E., Scheffner, M., and Del Sal, G. (1999). Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Embo J* 18, 6462-71.
- Gottifredi, V., and Prives, C. (2001). P53 and PML: new partners in tumor suppression. *Trends Cell Biol* 11, 184-87.
- Graham, F. L. (1984). Transformation by and oncogenicity of human adenoviruses. In *The adenoviruses*, H. S. Ginsberg, ed. (New York: Plenum Press), pp. 339-98.
- Graham, F. L., and Eb, A. J. v. d. (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* 54, 536-39.
- Grand, R. J., Grant, M. L., and Gallimore, P. H. (1994). Enhanced expression of p53 in human cells infected with mutant adenoviruses. *Virology* 203, 229-40.
- Grand, R. J., Lecane, P. S., Roberts, S., Grant, M. L., Lane, D. P., Young, L. S., Dawson, C. W., and Gallimore, P. H. (1993). Overexpression of wild-type p53 and c-Myc in human fetal cells transformed with adenovirus early region 1. *Virology* 193, 579-91.
- Grand, R. J., Parkhill, J., Szeszak, T., Rookes, S. M., Roberts, S., and Gallimore, P. H. (1999). Definition of a major p53 binding site on Ad2E1B58K protein and a possible nuclear localization signal on the Ad12E1B54K protein. *Oncogene* 18, 955-65.
- Gravel, A., Gosselin, J., and Flamand, L. (2002). Human herpesvirus 6 immediate-early 1 protein is a sumoylated nuclear phosphoprotein co-localizing with promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies. *J Biol Chem* 18, [pub ahead of print].
- Greber, U. F., Willetts, M., Webster, P., and Helenius, A. (1993). Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 75, 477-86.
- Green, M., Mackey, J. K., Wold, W. S., and Rigden, P. (1979). Thirty-one human adenovirus serotypes (Ad1-Ad31) form five groups (A-E) based upon DNA genome homologies. *Virology* 93, 481-92.
- Guo, A., Salomoni, P., Luo, J., Shih, A., Zhong, S., Gu, W., and Paolo Pandolfi, P. (2000). The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 2, 730-36.
- Hale, T. K., and Braithwaite, A. W. (1999). The adenovirus oncoprotein E1a stimulates binding of transcription factor ETF to transcriptionally activate the p53 gene. *J Biol Chem* 274, 23777-86.
- Han, J., Wallen, H. D., Nunez, G., and White, E. (1998). E1B 19,000-molecular-weight protein interacts with and inhibits CED-4-dependent, FLICE-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 18, 6052-62.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-80.
- Harlow, E., and Lane, D. (1988). *Antibodies, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, NY/ USA.
- Harlow, E., Pim, D. C., and Crawford, L. V. (1981). Complex of simian virus 40 large-T antigen and host 53,000-molecular-weight protein in monkey cells. *J Virol* 37, 564-73.
- Hashimoto, S., Ishii, A., and Yonehara, S. (1991). The E1b oncogene of adenovirus confers cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor and monoclonal anti-Fas antibody. *Int Immunol* 3, 343-51.
- Hateboer, G., Hijmans, E. M., Nooij, J. B., Schlenker, S., Jentsch, S., and Bernards, R. (1996). mUBC9, a novel adenovirus E1A-interacting protein that complements a yeast cell cycle defect. *J Biol Chem* 271, 25906-11.
- Hatta, M., and Fukamizu, A. (2001). PODs in the Nuclear Spot: Enigmas in the Magician's Pot. *Sci Sig Trans Know Env* 2001.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296-99.

- Haupt, Y., and Oren, M. (1996). p53-mediated apoptosis: mechanisms and regulation. *Behring Inst Mitt*, 32-59.
- He, D., Mu, Z. M., Le, X., Hsieh, J. T., Pong, R. C., Chung, L. W., and Chang, K. S. (1997). Adenovirus-mediated expression of PML suppresses growth and tumorigenicity of prostate cancer cells. *Cancer Res* 57, 1868-72.
- Heger, P., Rosorius, O., Hauber, J., and Stauber, R. H. (1999). Titration of cellular export factors, but not heteromultimerization, is the molecular mechanism of trans-dominant HTLV-1 rex mutants. *Oncogene* 18, 4080-90.
- Heider, J. A., Yu, Y., Shenk, T., and Alwine, J. C. (2002). Characterization of a human cytomegalovirus with phosphorylation site mutations in the immediate-early 2 protein. *J Virol* 76, 928-32.
- Hernandez, N. (1993). TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev* 7, 1291-308.
- Hitt, M. M., Addison, C. L., and Graham, F. L. (1997). Human adenovirus vectors for gene transfer into mammalian cells. *Adv Pharmacol* 40, 137-206.
- Hochstrasser, M. (2001). SP-RING for SUMO: new functions bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell* 107, 5-8.
- Hochstrasser, M. (1998). There's the rub: a novel ubiquitin-like modification linked to cell cycle regulation. *Genes Dev* 12, 901-07.
- Hofmann, H., Floss, S., and Stamminger, T. (2000). Covalent modification of the transactivator protein IE2-p86 of human cytomegalovirus by conjugation to the ubiquitin-homologous proteins SUMO-1 and hSMT3b. *J Virol* 74, 2510-24.
- Holaska, J. M., Black, B. E., Love, D. C., Hanover, J. A., Leszyk, J., and Paschal, B. M. (2001). Calreticulin Is a receptor for nuclear export. *J Cell Biol* 152, 127-40.
- Honda, R., and Yasuda, H. (2000). Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. *Oncogene* 19, 1473-76.
- Horridge, J. J., and Leppard, K. N. (1998). RNA-binding activity of the E1B 55-kilodalton protein from human adenovirus type 5. *J Virol* 72, 9374-79.
- Ibelgaufts, H., Doerfler, W., Scheidtmann, K. H., and Wechsler, W. (1980). Adenovirus type 12-induced rat tumor cells of neuroepithelial origin: persistence and expression of the viral genome. *J Virol* 33, 423-37.
- Ibelgaufts, H., Jones, K. W., Maitland, N., and Shaw, J. F. (1982). Adenovirus-related RNA sequences in human neurogenic tumours. *Acta Neuropathol. Berl* 56, 113-17.
- Imperiale, M. J., Akusjnarvi, G., and Leppard, K. N. (1995). Post-transcriptional control of adenovirus gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 199, 139-71.
- Ishov, A. M., Sotnikov, A. G., Negorev, D., Vladimirova, O. V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E. T., Strauss, J. F., 3rd, and Maul, G. G. (1999). PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol* 147, 221-34.
- Jackson, P., Bos, E., and Braithwaite, A. W. (1993). Wild-type mouse p53 down-regulates transcription from different virus enhancer/promoters. *Oncogene* 8, 589-97.
- Jackson, P. K. (2001). A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. *Genes Dev* 15, 3053-8.
- Jakoby, W. B., and Pastan, H. I. (1979). Cell Culture. *Methods in enzymology* LVIII.
- Jansen-Durr, P. (1996). How viral oncogenes make the cell cycle. *Trends Genet* 12, 270-75.
- Jansen-Durr, P. (1996). Viral oncogenesis and cell cycle control. *Virus Res* 42, 187-91.
- Javier, R., Raska, K., Jr., Macdonald, G. J., and Shenk, T. (1991). Human adenovirus type 9-induced rat mammary tumors. *J Virol* 65, 3192-202.
- Jensen, K., Shiels, C., and Freemont, P. S. (2001). PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* 20, 7223-33.
- Johansson, K., Persson, H., Lewis, A. M., Pettersson, U., Tibbetts, C., and Philipson, L. (1978). Viral DNA sequences and gene products in hamster cells transformed by adenovirus type 2. *J Virol* 27, 628-39.
- Johansson, K., Pettersson, U., Philipson, L., and Tibbetts, C. (1977). Reassociation of complementary strand-specific adenovirus type 2 DNA with viral DNA sequences of transformed cells. *J Virol* 23, 29-35.
- Johnson, E. S., and Blobel, G. (1999). Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. *J Cell Biol* 147, 981-94.
- Johnson, E. S., and Gupta, A. A. (2001). An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* 106, 735-44.
- Jonsson, N., and Ankerst, J. (1977). Studies on adenovirus type 9-induced mammary fibroadenomas in rats and their malignant transformation. *Cancer* 39, 2513-19.

- Kahyo, T., Nishida, T., and Yasuda, H. (2001). Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell* 8, 713-18.
- Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H. P., Fukuda-Kamitani, T., and Yeh, E. T. (1998). Characterization of a second member of the sentrin family of ubiquitin-like proteins. *J Biol Chem* 273, 11349-53.
- Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H. P., Wada, H., Fukuda-Kamitani, T., and Yeh, E. T. (1998). Identification of three major sentrinization sites in PML. *J Biol Chem* 273, 26675-82.
- Kao, C. C., Yew, P. R., and Berk, A. J. (1990). Domains required for in vitro association between the cellular p53 and the adenovirus 2 E1B 55K proteins. *Virology* 179, 806-14.
- Katano, H., Ogawa-Goto, K., Hasegawa, H., Kurata, T., and Sata, T. (2001). Human-herpesvirus-8-encoded K8 protein colocalizes with the promyelocytic leukemia protein (PML) bodies and recruits p53 to the PML bodies. *Virology* 286, 446-55.
- Kawabe, Y., Seki, M., Seki, T., Wang, W. S., Imamura, O., Furuichi, Y., Saitoh, H., and Enomoto, T. (2000). Covalent modification of the Werner's syndrome gene product with the ubiquitin-related protein, SUMO-1. *J Biol Chem* 275, 20963-66.
- Kim, Y. H., Choi, C. Y., and Kim, Y. (1999). Covalent modification of the homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) by the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12350-55.
- Kirn, D. (2001). Clinical research results with dl1520 (Onyx-015), a replication-selective adenovirus for the treatment of cancer: what have we learned? *Gene Ther* 8, 89-98.
- Klionsky, D. J., and Emr, S. D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290, 1717-21.
- Knoepfler, P. S., and Eisenman, R. N. (1999). Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell* 99, 447-50.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H. D., Mayer, T. U., and Jentsch, S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96, 635-44.
- Kornitzer, D., and Ciechanover, A. (2000). Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *J Cell Physiol* 182, 1-11.
- Kouzarides, T. (1999). Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev* 9, 40-48.
- Krätzer, F., Rosorius, O., Heger, P., Hirschmann, N., Dobner, T., Hauber, J., and Stauber, R. H. (2000). The adenovirus type 5 E1B-55k oncoprotein is a highly active shuttle protein and shuttling is independent of E4orf6, p53 and Mdm2. *Oncogene* 19, 850-57.
- Kubbutat, M. H., Jones, S. N., and Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299-303.
- Kudo, N., Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E. P., Yoneda, Y., Yanagida, M., Horinouchi, S., and Yoshida, M. (1998). Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp Cell Res* 242, 540-47.
- Kuhlmann, I., Achten, S., Rudolph, R., and 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.
- Kuwano, K., Kawasaki, M., Kunitake, R., Hagimoto, N., Nomoto, Y., Matsuba, T., Nakanishi, Y., and Hara, N. (1997). Detection of group C adenovirus DNA in small-cell lung cancer with the nested polymerase chain reaction. *J. Cancer Res. Clin Oncol* 123, 377-82.
- Kuwano, K., Nomoto, Y., Kunitake, R., Hagimoto, N., Matsuba, T., Nakanishi, Y., and Hara, N. (1997). Detection of adenovirus E1A DNA in pulmonary fibrosis using nested polymerase chain reaction. *Eur Respir J* 10, 1445-49.
- Kwek, S. S., Derry, J., Tyner, A. L., Shen, Z., and Gudkov, A. V. (2001). Functional analysis and intracellular localization of p53 modified by SUMO-1. *Oncogene* 20, 2587-99.
- Kzhyshkowska, J., Schutt, H., Liss, M., Kremmer, E., Stauber, R., Wolf, H., and Dobner, T. (2001). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1B-AP5 is methylated in its Arg-Gly-Gly (RGG) box and interacts with human arginine methyltransferase HRMT1L1. *Biochem J* 358, 305-14.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-85.
- Laherty, C. D., Yang, W. M., Sun, J. M., Davie, J. R., Seto, E., and Eisenman, R. N. (1997). Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* 89, 349-56.
- Lain, S., Midgley, C., Sparks, A., Lane, E. B., and Lane, D. P. (1999). An inhibitor of nuclear export activates the p53 response and induces the localization of HDM2 and p53 to U1A-positive nuclear bodies associated with the PODs. *Exp Cell Res* 248, 457-72.
- Lain, S., Xirodimas, D., and Lane, D. P. (1999). Accumulating active p53 in the nucleus by inhibition of nuclear export: a novel strategy to promote the p53 tumor suppressor function. *Exp Cell Res* 253, 315-24.
- Lallemand-Breitenbach, V., Zhu, J., Puvion, F., Koken, M., Honore, N., Doubekovsky, A., Duprez, E., Pandolfi, P. P., Puvion, E., Freemont, P., and de The, H. (2001). Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *J Exp Med* 193, 1361-71.
- LaMorte, V. J., Dyck, J. A., Ochs, R. L., and Evans, R. M. (1998). Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4991-96.

- Lawler, M., Humphries, P., O'Farrelly, C., Hoey, H., Sheils, O., Jeffers, M., O'Briain, D. S., and Kelleher, D.** (1994). Adenovirus 12 E1A gene detection by polymerase chain reaction in both the normal and coeliac duodenum. *Gut* 35, 1226-32.
- Le, X. F., Vallian, S., Mu, Z. M., Hung, M. C., and Chang, K. S.** (1998). Recombinant PML adenovirus suppresses growth and tumorigenicity of human breast cancer cells by inducing G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Oncogene* 16, 1839-49.
- Lehembre, F., Badenhurst, P., Muller, S., Travers, A., Schweisguth, F., and Dejean, A.** (2000). Covalent modification of the transcriptional repressor tramtrack by the ubiquitin-related protein Smt3 in *Drosophila* flies. *Mol Cell Biol* 20, 1072-82.
- Leppard, K. N., and Everett, R. D.** (1999). The adenovirus type 5 E1b 55K and E4 Orf3 proteins associate in infected cells and affect ND10 components. *J Gen Virol* 80, 997-1008.
- Leveillard, T., Andera, L., Bissonnette, N., Schaeffer, L., Bracco, L., Egly, J. M., and Wasylyk, B.** (1996). Functional interactions between p53 and the TFIIH complex are affected by tumour-associated mutations. *Embo J* 15, 1615-24.
- Levine, A. J.** (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-31.
- Levine, A. J.** (1990). Tumor suppressor genes. *Bioessays* 12, 60-6.
- Li, H., Leo, C., Zhu, J., Wu, X., O'Neil, J., Park, E. J., and Chen, J. D.** (2000). Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Mol Cell Biol* 20, 1784-96.
- Li, S. J., and Hochstrasser, M.** (1999). A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* 398, 246-51.
- Li, S. J., and Hochstrasser, M.** (2000). The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein. *Mol Cell Biol* 20, 2367-77.
- Li, Z., Bailey, A. D., Buchowski, J., and Weiner, A. M.** (1998). A tandem array of minimal U1 small nuclear RNA genes is sufficient to generate a new adenovirus type 12-inducible chromosome fragile site. *J Virol* 72, 4205-11.
- Li, Z., Yu, A., and Weiner, A. M.** (1998). Adenovirus type 12-induced fragility of the human RNU2 locus requires p53 function. *J Virol* 72, 4183-91.
- Liakopoulos, D., Doenges, G., Matuschewski, K., and Jentsch, S.** (1998). A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system. *Embo J* 17, 2208-14.
- Liao, D., Yu, A., and Weiner, A. M.** (1999). Coexpression of the adenovirus 12 E1B 55 kDa oncoprotein and cellular tumor suppressor p53 is sufficient to induce metaphase fragility of the human RNU2 locus. *Virology* 254, 11-23.
- Liu, L., Scolnick, D. M., Trievel, R. C., Zhang, H. B., Marmorstein, R., Halazonetis, T. D., and Berger, S. L.** (1999). p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 19, 1202-09.
- Liu, Y., Colosimo, A. L., Yang, X. J., and Liao, D.** (2000). Adenovirus E1B 55-kilodalton oncoprotein inhibits p53 acetylation by PCAF. *Mol Cell Biol* 20, 5540-53.
- Liu, Y., Colosimo, A. L., Yang, X. J., and Liao, D.** (2000). Adenovirus E1B 55-kilodalton oncoprotein inhibits p53 acetylation by PCAF. *Mol Cell Biol* 20, 5540-53.
- Loeb, K. R., and Haas, A. L.** (1992). The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins. *J Biol Chem* 267, 7806-13.
- Long, X., and Griffith, L. C.** (2000). Identification and characterization of a SUMO-1 conjugation system that modifies neuronal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 275, 40765-76.
- Lorick, K. L., Jensen, J. P., Fang, S., Ong, A. M., Hatakeyama, S., and Weissman, A. M.** (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11364-69.
- Lu, H., and Levine, A. J.** (1995). Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5154-58.
- Mackey, J. K., Rigden, P. M., and 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.
- Mackey, J. K., Wold, W. S., Rigden, P., and Green, M.** (1979). Transforming region of group A, B, and C adenoviruses: DNA homology studies with twenty-nine human adenovirus serotypes. *J Virol* 29, 1056-64.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., and Melchior, F.** (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88, 97-107.
- Mahajan, R., Gerace, L., and Melchior, F.** (1998). Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association. *J Cell Biol* 140, 259-70.
- Maheswaran, S., Englert, C., Bennett, P., Heinrich, G., and Haber, D. A.** (1995). The WT1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Genes Dev.* 9, 2143-56.

- Maheswaran, S., Englert, C., Lee, S. B., Ezzel, R. M., Settleman, J., and Haber, D. A.** (1998). E1B 55K sequesters WT1 along with p53 within a cytoplasmic body in adenovirus-transformed kidney cells. *Oncogene* 16, 2041-50.
- Maheswaran, S., Park, S., Bernhard, A., Morris, J. F., Rauscher III, F. J., Hill, D. E., and Haber, D. A.** (1993). Physical and functional interaction between WT1 and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 5100-04.
- Maitland, N. J., Kinross, J. H., Busuttil, A., Ludgate, S. M., Smart, G. E., and Jones, K. W.** (1981). The detection of DNA tumour virus-specific RNA sequences in abnormal human cervical biopsies by in situ hybridization. *J. Gen. Virol.* 55, 123-37.
- Mak, I., Mak, S., and Benchimol, S.** (1988). Expression of the cellular p53 protein in cells transformed by adenovirus 12 and viral DNA fragments. *Virology* 163, 201-04.
- Mantovani, F., and Banks, L.** (2001). The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 20, 7874-87.
- Mantovani, F., and Banks, L.** (1999). The interaction between p53 and papillomaviruses. *Semin Cancer Biol* 9, 387-95.
- Mao, Y., Desai, S. D., and Liu, L. F.** (2000). SUMO-1 conjugation to human DNA topoisomerase II isozymes. *J Biol Chem* 275, 26066-73.
- Mao, Y., Sun, M., Desai, S. D., and Liu, L. F.** (2000). SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: A possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4046-51.
- Martin, M. E. and A. J. Berk** (1998). Adenovirus E1B 55K represses p53 activation in vitro. *J. Virol.* 72, 3146-54.
- Martin, M. E. and A. J. Berk** (1999). Corepressor required for adenovirus E1B 55,000-molecular-weight protein repression of basal transcription. *Mol Cell Biol* 19, 3403-14.
- Matera, A. G.** (1999). Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol* 9, 302-09.
- Mattsson, K., Pokrovskaja, K., Kiss, C., Klein, G., and Szekely, L.** (2001). Proteins associated with the promyelocytic leukemia gene product (PML)-containing nuclear body move to the nucleolus upon inhibition of proteasome-dependent protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1012-17.
- Matunis, M. J., Coutavas, E., and Blobel, G.** (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 135, 1457-70.
- Matunis, M. J., Wu, J., and Blobel, G.** (1998). SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 140, 499-509.
- Maul, G. G.** (1998). Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication. *Bioessays* 20, 660-67.
- Maul, G. G., Negorev, D., Bell, P., and Ishov, A. M.** (2000). Review: properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs. *J Struct Biol* 129, 278-87.
- Mayol, X., and Grana, X.** (1997). pRB, p107 and p130 as transcriptional regulators: role in cell growth and differentiation. *Prog Cell Cycle Res* 3, 157-69.
- McLorie, W., McGlade, C. J., Takayasu, D., and Branton, P. E.** (1991). Individual adenovirus E1B proteins induce transformation independently but by additive pathways. *J Gen Virol* 72, 1467-71.
- Meijer, I., Boot, A. J., Mahabir, G., Zantema, A., van der Eb, A. J.** (1992). Reduced binding activity of transcription factor NF-kappa B accounts for MHC class I repression in adenovirus type 12 E 1-transformed cells. *Cell Immunol* 145, 56-65.
- Melchior, F.** (2000). SUMO-nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 591-626.
- Melchior, F., and Hengst, L.** (2000). Mdm2-SUMO1: is bigger better? *Nat Cell Biol* 2, E161-63.
- Meluh, P. B., and Koshland, D.** (1995). Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C. *Mol Biol Cell* 6, 793-807.
- Merrick, R. M., Grand, R. J., Brown, J. C., and Gallimore, P. H.** (1991). The use of beta-galactosidase fusion proteins encoding the early region 1 transforming proteins of adenovirus type 12 to examine the humoral response in tumour-bearing animals. *J Gen Virol* 72, 955-60.
- Minty, A., Dumont, X., Kaghad, M., and Caput, D.** (2000). Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *J Biol Chem* 275, 36316-23.
- Mitsudomi, T., Steinberg, S. M., Nau, M. M., Carbone, D., D'Amico, D., Bodner, S., Oie, H. K., Linnoila, R. I., Mulshine, J. L., Minna, J. D., and 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.
- Miyashita, T., Harigai, M., Hanada, M., and Reed, J. C.** (1994). Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res* 54, 3131-35.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B., and Reed, J. C.** (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799-805.

- Modrow, S., and Falke, D.** (1997). *Molekulare Virologie*. Spektrum Verlag, Heidelberg.
- Moore, P. S., and Chang, Y.** (1998). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded oncogenes and oncogenesis. *J Natl Cancer Inst Monogr* 23, 65-71.
- Morris, E. J., and Dyson, N. J.** (2001). Retinoblastoma protein partners. *Adv Cancer Res* 82, 1-54.
- Mu, Z. M., Chin, K. V., Liu, J. H., Lozano, G., and Chang, K. S.** (1994). PML, a growth suppressor disrupted in acute promyelocytic leukemia. *Mol Cell Biol* 14, 6858-67.
- Mu, Z. M., Le, X. F., Glassman, A. B., and Chang, K. S.** (1996). The biologic function of PML and its role in acute promyelocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 23, 277-85.
- Muller, H., and Helin, K.** (2000). The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. *Biochim Biophys Acta* 1470, M1-12.
- Muller, S., Berger, M., Lehenbre, F., Seeler, J. S., Haupt, Y., and Dejean, A.** (2000). c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 275, 13321-29.
- Muller, S., and Dejean, A.** (1999). Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption. *J Virol* 73, 5137-43.
- Muller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S.** (2001). SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 202-10.
- Muller, S., Matunis, M. J., and Dejean, A.** (1998). Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *Embo J* 17, 61-70.
- Mulligan, G., and Jacks, T.** (1998). The retinoblastoma gene family: cousins with overlapping interests. *Trends Genet* 14, 223-29.
- Murakami, S.** (2001). Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J Gastroenterol* 36, 651-60.
- Muralidhar, S., Doniger, J., Mendelson, E., Araujo, J. C., Kashanchi, F., Azumi, N., Brady, J. N., and Rosenthal, L. J.** (1996). Human cytomegalovirus mtrII oncoprotein binds to p53 and down-regulates p53-activated transcription. *J Virol* 70, 8691-700.
- Muratani, M., Gerlich, D., Janicki, S. M., Gebhard, M., Eils, R., and Spector, D. L.** (2001). Metabolic-energy-dependent movement of PML bodies within the mammalian cell nucleus. *Nat Cell Biol* 21, 106-10.
- Mymryk, J. S.** (1996). Tumour suppressive properties of the adenovirus 5 E1A oncogene. *Oncogene* 13, 1581-89.
- Negorev, D., Ishov, A. M., and Maul, G. G.** (2001). Evidence for separate ND10-binding and homo-oligomerization domains of Sp100. *J Cell Sci* 114, 59-68.
- Negorev, D., and Maul, G. G.** (2001). Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot. *Oncogene* 20, 7234-42.
- Nemerow, G. R.** (2000). Cell receptors involved in adenovirus entry. *Virology* 274, 1-4.
- Nemunaitis, J., Khuri, F., Ganly, I., Arseneau, J., Posner, M., Vokes, E., Kuhn, J., McCarty, T., Landers, S., Blackburn, A., Romel, L., Randlev, B., Kaye, S., and Kirn, D.** (2001). Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. *J Clin Oncol* 19, 289-98.
- Nevels, M., Rubenwolf, S., Spruss, T., Wolf, H., and 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., Rubenwolf, S., Spruss, T., Wolf, H., and Dobner, T.** (2000). Two distinct activities contribute to the oncogenic potential of the adenovirus type 5 E4orf6 protein. *J Virol* 74, 5168-81.
- Nevels, M., Spruss, T., Wolf, H., and 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., Tauber, B., Kremmer, E., Spruss, T., Wolf, H., and Dobner, T.** (1999). Transforming potential of the adenovirus type 5 E4orf3 protein. *J Virol* 73, 1591-600.
- Nevels, M., Tauber, B., Spruss, T., Wolf, H., and Dobner, T.** (2001). "Hit-and-run" transformation by adenovirus oncogenes. *J Virol* 75, 3089-94.
- Nevins, J. R.** (1995). Adenovirus E1A: transcription regulation and alteration of cell growth control. *Curr Top Microbiol Immunol* 199, 25-32.
- Nevins, J. R.** (2001). The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet* 10, 699-703.
- Nevins, J. R., and Vogt, P. K.** (1996). Cell transformation by viruses. In *Virology*, B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley, eds. (New York: Lippincott-Raven), pp. 301-43.
- Nielsen, U., Zimmer, S. G., Babiss, L. E.** (1991). Changes in NF-kappa B and ISGF3 DNA binding activities are responsible for differences in MHC and beta-IFN gene expression in Ad5- versus Ad12-transformed cells. *Embo J* 10, 4169-75.

- Niman, H. L., Houghten, R. A., Walker, L. E., Reisfeld, R. A., Wilson, I. A., Hogle, J. M., and Lerner, R. A. (1983). Generation of protein-reactive antibodies by short peptides is an event of high frequency: implications for the structural basis of immune recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 4949-53.
- Nishida, T., Kaneko, F., Kitagawa, M., and Yasuda, H. (2001). Characterization of a novel mammalian SUMO-1/Smt3-specific isopeptidase, a homologue of rat axam, which is an axin-binding protein promoting beta-catenin degradation. *J Biol Chem* 276, 39060-66.
- Nishida, T., Tanaka, H., and Yasuda, H. (2000). A novel mammalian Smt3-specific isopeptidase 1 (SMT3IP1) localized in the nucleolus at interphase. *Eur J Biochem* 267, 6423-27.
- Nordqvist, K., Ohman, K., and Akusjarvi, G. (1994). Human adenovirus encodes two proteins which have opposite effects on accumulation of alternatively spliced mRNAs. *Mol Cell Biol* 14, 437-45.
- Ohman, K., Nordqvist, K., and Akusjarvi, G. (1993). Two adenovirus proteins with redundant activities in virus growth facilitates tripartite leader mRNA accumulation. *Virology* 194, 50-58.
- Ohsumi, Y. (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 211-16.
- Oren, M. (1999). Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 274, 36031-34.
- Ossareh-Nazari, B., Gwizdek, C., and Dargemont, C. (2001). Protein export from the nucleus. *Traffic* 2, 684-89.
- Oswald, F., Dobner, T., and Lipp, M. (1996). The E2F transcription factor activates a replication-dependent human H2A gene in early S phase of the cell cycle. *Mol Cell Biol* 16, 1889-95.
- Paggi, M. G., Baldi, A., Bonetto, F., and Giordano, A. (1996). Retinoblastoma protein family in cell cycle and cancer: a review. *J Cell Biochem* 62, 418-30.
- Paraskeva, C., Brown, K. W., and Gallimore, P. H. (1982). Adenovirus-cell interactions early after infection: in vitro characteristics and tumorigenicity of adenovirus type 2-transformed rat liver epithelial cells. *J Gen Virol* 58 Pt 1, 73-81.
- Paraskeva, C., and Gallimore, P. H. (1980). Tumorigenicity and in vitro characteristics of rat liver epithelial cells and their adenovirus-transformed derivatives. *Int J Cancer* 25, 631-39.
- Pearson, B. E., Nasheuer, H. P., and Wang, T. S. (1991). Human DNA polymerase alpha gene: sequences controlling expression in cycling and serum-stimulated cells. *Mol Cell Biol* 11, 2081-95.
- Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P. P., and Pelicci, P. G. (2000). PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* 406, 207-10.
- Pearson, M., and Pelicci, P. G. (2001). PML interaction with p53 and its role in apoptosis and replicative senescence. *Oncogene* 20, 7250-56.
- Pfeffer, A., Schubbert, R., Orend, G., Hilger Eversheim, K., and 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.
- Pichler, A., Gast, A., Seeler, J. S., Dejean, A., and Melchior, F. (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* 108, 109-20.
- Pilder, S., Moore, M., Logan, J., and Shenk, T. (1986). The adenovirus E1B-55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs. *Mol Cell Biol* 6, 470-76.
- Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N. J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orloff, I., Lee, H. W., Cordon-Cardo, C., and DePinho, R. A. (1998). The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92, 713-23.
- Poukka, H., Aarnisalo, P., Karvonen, U., Palvimo, J. J., and Janne, O. A. (1999). Ubc9 interacts with the androgen receptor and activates receptor-dependent transcription. *J Biol Chem* 274, 19441-46.
- Poukka, H., Karvonen, U., Janne, O. A., and Palvimo, J. J. (2000). Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14145-50.
- Prives, C., and Hall, P. A. (1999). The p53 pathway. *J Pathol* 187, 112-26.
- Punga, T., and Akusjarvi, G. (2000). The adenovirus-2 E1B-55K protein interacts with a mSin3A/histone deacetylase 1 complex. *FEBS Lett* 476, 248-52.
- Putzer, B. M., Stiewe, T., Parssanedjad, K., Rega, S., and Esche, H. (2000). E1A is sufficient by itself to induce apoptosis independent of p53 and other adenoviral gene products. *Cell Death Differ* 7, 177-88.
- Puvion-Dutilleul, F., Chelbi-Alix, M. K., Koken, M., Quignon, F., Puvion, E., and de The, H. (1995). Adenovirus infection induces rearrangements in the intranuclear distribution of the nuclear body-associated PML protein. *Exp Cell Res* 218, 9-16.
- Puvion-Dutilleul, F., Legrand, V., Mehtali, M., Chelbi-Alix, M. K., de The, H., and Puvion, E. (1999). Deletion of the fiber gene induces the storage of hexon and penton base proteins in PML/Sp100-containing inclusions during adenovirus infection. *Biol Cell* 91, 617-28.

- Querido, E., Blanchette, P., Yan, Q., Kamura, T., Morrison, M., Boivin, D., Kaelin, W. G., Conaway, R. C., Conaway, J. W., and Branton, P. E. (2001). Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes Dev* 15, 3104-17.
- Querido, E., Marcellus, R. C., Lai, A., Charbonneau, R., Teodoro, J. G., Ketner, G., and Branton, P. E. (1997). Regulation of p53 levels by the E1B 55-kilodalton protein and E4orf6 in adenovirus-infected cells. *J Virol* 71, 3788-98.
- Querido, E., Morrison, M. R., Chu-Pham-Dang, H., Thirlwell, S. W., Boivin, D., Branton, P. E., and Morisson, M. R. (2001). Identification of three functions of the adenovirus e4orf6 protein that mediate p53 degradation by the E4orf6-E1B55K complex. *J Virol* 75, 699-709.
- Rangasamy, D., and Wilson, V. G. (2000). Bovine papillomavirus E1 protein is sumoylated by the host cell Ubc9 protein. *J Biol Chem* 275, 30487-95.
- Rangasamy, D., Woytek, K., Khan, S. A., and Wilson, V. G. (2000). SUMO-1 modification of bovine papillomavirus E1 protein is required for intranuclear accumulation. *J Biol Chem* 275, 37999-8004.
- Rao, L., Debbas, M., Sabbatini, P., Hockenbery, D., Korsmeyer, S., and White, E. (1992). The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7742-46.
- Regad, T., and Chelbi-Alix, M. K. (2001). Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene* 20, 7274-86.
- Regad, T., Saib, A., Lallemand-Breitenbach, V., Pandolfi, P. P., de The, H., and Chelbi-Alix, M. K. (2001). PML mediates the interferon-induced antiviral state against a complex retrovirus via its association with the viral transactivator. *Embo J* 20, 3495-505.
- Reich, N. C., Sarnow, P., Duprey, E., and Levine, A. J. (1983). Monoclonal antibodies which recognize native and denatured forms of the adenovirus DNA-binding protein. *Virology* 128, 480-84.
- Rodriguez, M. S., Dargemont, C., and Hay, R. T. (2001). SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem* 276, 12654-59.
- Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Midgley, C. A., Lane, D. P., and Hay, R. T. (1999). SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *Embo J* 18, 6455-61.
- Roth, J., Dobbstein, M., Freedman, D. A., Shenk, T., and Levine, A. J. (1998). Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *Embo J* 17, 554-64.
- Routes, J. M., Bellgrau, D., McGrory, W. J., Bautista, D. S., Graham, F. L., and Cook, J. L. (1991). Anti-adenovirus type 5 cytotoxic T lymphocytes: immunodominant epitopes are encoded by the E1A gene. *J Virol* 65, 1450-57.
- Rubenwolf S. (1999). Destabilisierung des Tumorsuppressorproteins p53 durch adenovirale Proteine. Dissertation. Universität Regensburg.
- Rubenwolf, S., Schutt, H., Nevels, M., Wolf, H., and Dobner, T. (1997). Structural analysis of the adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton-E4orf6 protein complex. *J Virol* 71, 1115-23.
- Russel, W. C. (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* 81, 2573-04.
- Sabbatini, P., Chiou, S. K., Rao, L., and White, E. (1995). Modulation of p53-mediated transcriptional repression and apoptosis by the adenovirus E1B 19K protein. *Mol Cell Biol* 15, 1060-70.
- Sabbatini, P., Lin, J., Levine, A. J., and White, E. (1995). Essential role for p53-mediated transcription in E1A-induced apoptosis. *Genes Dev* 9, 2184-92.
- Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F., and Grosschedl, R. (2001). PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev* 15, 3088-103.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91.
- Saitoh, H., and Hinchey, J. (2000). Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem* 275, 6252-58.
- Saitoh, H., Pizzi, M. D., and Wang, J. (2002). Perturbation of SUMOlation enzyme Ubc9 by distinct domain within nucleoporin RanBP2/Nup358. *J Biol Chem* 277, 4755-63.
- Saitoh, H., Sparrow, D. B., Shiomi, T., Pu, R. T., Nishimoto, T., Mohun, T. J., and Dasso, M. (1998). Ubc9p and the conjugation of SUMO-1 to RanGAP1 and RanBP2. *Curr Biol* 8, 121-24.
- Sakaguchi, K., Herrera, J. E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C. W., and Appella, E. (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* 12, 2831-41.
- Sanchez Prieto, R., de Alava, E., Palomino, T., Guinea, J., Fernandez, V., Cebrian, S., M, L. L., Cabello, P., Martin, P., San Roman, C., Bornstein, R., Pardo, J., Martinez, A., Diaz Espada, F., Barrios, Y., and Ramon y Cajol, S. (1999). An association between viral genes and human oncogenic alterations: the adenovirus E1A induces the Ewing tumor fusion transcript EWS-FLI1. *Nat Med* 5, 1076-79.

- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1992). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* 24, 104-08.
- Sarnow, P., Ho, Y. S., Williams, J., and Levine, A. J. (1982). Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 28, 387-94.
- Sarnow, P., Sullivan, C. A., and Levine, A. J. (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, 510-17.
- Sawada, Y., Fohring, B., Shenk, T. E., Raska, K., Jr. (1985). Tumorigenicity of adenovirus-transformed cells: region E1A of adenovirus 12 confers resistance to natural killer cells. *Virology* 147, 413-21.
- Schmidt, D., and Muller, S. (2002). Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 26, 2872-77.
- Schrier, P. I., Bernards, R., Vaessen, R. T., Houweling, A., van der Eb, A. J. (1983). Expression of class I major histocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells. *Nature* 305, 771-75.
- Schulze, A., Zerfass, K., Spitkovsky, D., Middendorp, S., Berges, J., Helin, K., Jansen-Durr, P., and Henglein, B. (1995). Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11264-68.
- Schütt, H. (2000). Molekularbiologische Charakterisierung des hnRNP-Proteins E1B-AP5. Dissertation. Universität Regensburg.
- Schwienhorst, I., Johnson, E. S., and Dohmen, R. J. (2000). SUMO conjugation and deconjugation. *Mol Gen Genet* 263, 771-86.
- Seeler, J. S., and Dejean, A. (1999). The PML nuclear bodies: actors or extras? *Curr Opin Genet Dev* 9, 362-67.
- Seeler, J. S., and Dejean, A. (2001). SUMO: of branched proteins and nuclear bodies. *Oncogene* 20, 7243-49.
- Seeler, J. S., Marchio, A., Sitterlin, D., Transy, C., and Dejean, A. (1998). Interaction of SP100 with HP1 proteins: a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7316-21.
- Sharma, R. C., and Schimke, R. T. (1996). Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium. *Biotechniques* 20, 42-44.
- Sharp, P. A., Pettersson, U., and Sambrook, J. (1974). Viral DNA in transformed cells. I. A study of the sequences of adenovirus 2 DNA in a line of transformed rat cells using specific fragments of the viral genome. *J Mol Biol* 86, 709-26.
- Sheil, J. M., Gallimore, P. H., Zimmer, S. G., Sopori, M. L. (1984). Susceptibility of Adenovirus 2-transformed rat cell lines to natural killer (NK) cells: direct correlation between NK resistance and in vivo tumorigenesis. *J Immunol* 132, 1578-82.
- Shen, Y., Kitzes, G., Nye, J. A., Fattaey, A., and Hermiston, T. (2001). Analyses of single-amino-acid substitution mutants of adenovirus type 5 E1B-55K protein. *J Virol* 75, 4297-307.
- Shen, Y., and Shenk, T. (1994). Relief of p53-mediated transcriptional repression by the adenovirus E1B 19-kDa protein or the cellular Bcl-2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8940-44.
- Shenk, T. (1996). Adenoviridae: the viruses and their replication. In *Virology*, B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley, eds. (New York: Lippincott-Raven), pp. 2111-48.
- Shepherd, S. E., Howe, J. A., Mymryk, J. S., and Bayley, S. T. (1993). Induction of the cell cycle in baby rat kidney cells by adenovirus type 5 E1A in the absence of E1B and a possible influence of p53. *J Virol* 67, 2944-49.
- Skinner, G. R. (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.
- Smiley, J. K., Young, M. A., and Flint, S. J. (1990). Intracellular location of the adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton protein. *J Virol* 64, 4558-64.
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., and Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51, 1409-16.
- Spengler, M. L., Kurapatwinski, K., Black, A. R., and Azizkhan-Clifford, J. (2002). SUMO-1 modification of human cytomegalovirus IE1/IE2. *J Virol* 76, 2990-96.
- Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C., and Weis, K. (1997). Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* 90, 1041-50.
- Steegenga, W. T., Riteco, N., Jochemsen, A. G., Fallaux, F. J., and Bos, J. L. (1998). The large E1B protein together with the E4orf6 protein target p53 for active degradation in adenovirus infected cells. *Oncogene* 16, 349-57.
- Steegenga, W. T., Van Laar, T., Shvarts, A., Terleth, C., Van der Eb, A. J., and Jochemsen, A. G. (1995). Distinct modulation of p53 activity in transcription and cell-cycle regulation by the large (54 kDa) and small (21 kDa) adenovirus E1B proteins. *Virology* 212, 543-54.
- Sternsdorf, T., Grotzinger, T., Jensen, K., and Will, H. (1997). Nuclear dots: actors on many stages. *Immunobiology* 198, 307-31.
- Sternsdorf, T., Jensen, K., Reich, B., and Will, H. (1999). The nuclear dot protein sp100, characterization of domains necessary for dimerization, subcellular localization, and modification by small ubiquitin-like modifiers. *J Biol Chem* 274, 12555-66.

- Sternsdorf, T., Jensen, K., and Will, H.** (1997). Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1. *J Cell Biol* 139, 1621-34.
- Stiewe, T., Parssanedjad, K., Esche, H., Opalka, B., and Putzer, B. M.** (2000). E1A overcomes the apoptosis block in BCR-ABL+ leukemia cells and renders cells susceptible to induction of apoptosis by chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 60, 3957-64.
- Stuurman, N., de Graaf, A., Floore, A., Josso, A., Humbel, B., de Jong, L., and van Driel, R.** (1992). A monoclonal antibody recognizing nuclear matrix-associated nuclear bodies. *J Cell Sci* 101, 773-84.
- Subler, M. A., Martin, D. W., and Deb, S.** (1992). Inhibition of viral and cellular promoters by human wild-type p53. *J Virol* 66, 4757-62.
- Subler, M. A., Martin, D. W., and Deb, S.** (1994). Overlapping domains on the p53 protein regulate its transcriptional activation and repression functions. *Oncogene* 9, 1351-59.
- Subramanian, T., Tarodi, B., and Chinnadurai, G.** (1995). Functional similarity between adenovirus E1B 19-kDa protein and proteins encoded by Bcl-2 proto-oncogene and Epstein-Barr virus BHRF1 gene. *Curr Top Microbiol Immunol* 199, 153-61.
- Subramanian, T., Tarodi, B., Govindarajan, R., Boyd, J. M., Yoshida, K., and Chinnadurai, G.** (1993). Mutational analysis of the transforming and apoptosis suppression activities of the adenovirus E1B 175R protein. *Gene* 124, 173-81.
- Szekely, L., Pokrovskaja, K., Jiang, W. Q., de The, H., Ringertz, N., and Klein, G.** (1996). The Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-5 accumulates in PML-containing bodies. *J Virol* 70, 2562-68.
- Takahashi, Y., Iwase, M., Konishi, M., Tanaka, M., Toh-e, A., and Kikuchi, Y.** (1999). Smt3, a SUMO-1 homolog, is conjugated to Cdc3, a component of septin rings at the mother-bud neck in budding yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 259, 582-87.
- Takahashi, Y., Kahyo, T., Toh, E. A., Yasuda, H., and Kikuchi, Y.** (2001). Yeast Uhl1/Siz1 is a novel SUMO1/Smt3 ligase for septin components and functions as an adaptor between conjugating enzyme and substrates. *J Biol Chem* 276, 48973-77.
- Takahashi, Y., Toh-e, A., and Kikuchi, Y.** (2001). A novel factor required for the SUMO1/Smt3 conjugation of yeast septins. *Gene* 275, 223-31.
- Tatham, M. H., Jaffray, E., Vaughan, O. A., Desterro, J. M., Botting, C. H., Naismith, J. H., and Hay, R. T.** (2001). Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* 276, 35368-74.
- Täuber, B., and Dobner, T.** (2001). Adenovirus early E4 genes in viral oncogenesis. *Oncogene* 20, 7847-54.
- Täuber, B., and Dobner, T.** (2001). Molecular regulation and biological function of adenovirus early genes: the E4 ORFs. *Gene*, 278, 1-23.
- Teodoro, J. G., and Branton, P. E.** (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, 3620-27.
- Teodoro, J. G., Halliday, T., Whalen, S. G., Takayesu, D., Graham, F. L., and Branton, P. E.** (1994). Phosphorylation at the carboxy terminus of the 55-kilodalton adenovirus type 5 E1B protein regulates transforming activity. *J Virol* 68, 776-86.
- Thomas, D. L., Schaack, J., Vogel, H., and Javier, R.** (2001). Several E4 region functions influence mammary tumorigenesis by human adenovirus type 9. *J Virol* 75, 557-68.
- Thomas, M., Pim, D., and Banks, L.** (1999). The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* 18, 7690-700.
- Thut, C. J., Chen, J. L., Klemm, R., and Tjian, R.** (1995). p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science* 267, 100-04.
- Tooze, J.** (1981). DNA tumor viruses. In Cold Spring Harbor (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 943-1054.
- Trentin, J. J., Yabe, Y., and Taylor, G.** (1962). The quest for human cancer viruses. *Science* 137, 835-49.
- Turnell, A. S., Grand, R. J., Gorbea, C., Zhang, X., Wang, W., Mymryk, J. S., and Gallimore, P. H.** (2000). Regulation of the 26S proteasome by adenovirus E1A. *Embo J* 19, 4759-73.
- Vallian, S., Chin, K. V., and Chang, K. S.** (1998). The promyelocytic leukemia protein interacts with Sp1 and inhibits its transactivation of the epidermal growth factor receptor promoter. *Mol Cell Biol* 18, 7147-56.
- van den Elsen, P. J., Houweling, A., and van der Eb, A. J.** (1983). Morphological transformation of human adenoviruses is determined to a large extent by gene products of region E1a. *Virology* 131, 242-46.
- von Mikecz, A., Zhang, S., Montminy, M., Tan, E. M., and Hemmerich, P.** (2000). CREB-binding protein (CBP)/p300 and RNA polymerase II colocalize in transcriptionally active domains in the nucleus. *J Cell Biol* 150, 265-73.
- Vousden, K. H.** (1995). Regulation of the cell cycle by viral oncoproteins. *Semin Cancer Biol* 6, 109-16.
- Walker, T. A., Wilson, B. A., Lewis, A. M., Jr., Cook, J. L.** (1991). E1A oncogene induction of cytolytic susceptibility eliminates sarcoma cell tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8491-95.

- Wang, X. W., Vermeulen, W., Coursen, J. D., Gibson, M., Lupold, S. E., Forrester, K., Xu, G., Elmore, L., Yeh, H., Hoeijmakers, J. H., and Harris, C. C. (1996). The XPB and XPD DNA helicases are components of the p53-mediated apoptosis pathway. *Genes Dev* 10, 1219-32.
- Wang, X. W., Yeh, H., Schaeffer, L., Roy, R., Moncollin, V., Egly, J. M., Wang, Z., Freidberg, E. C., Evans, M. K., Taffe, B. G., and et al. (1995). p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nat Genet* 10, 188-95.
- Wang, Z. G., Ruggero, D., Ronchetti, S., Zhong, S., Gaboli, M., Rivi, R., and Pandolfi, P. P. (1998). PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat Genet* 20, 266-72.
- Weber, J. D., Taylor, L. J., Roussel, M. F., Sherr, C. J., and Bar-Sagi, D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* 1, 20-6.
- Weigel, S., and Dobbelstein, M. (2000). The nuclear export signal within the E4orf6 protein of adenovirus type 5 supports virus replication and cytoplasmic accumulation of viral mRNA. *J Virol* 74, 764-72.
- Weissman, A. M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 169-78.
- White, E. (1998). Regulation of apoptosis by adenovirus E1A and E1B oncoproteins. *Semin Virol* 8, 505-13.
- White, E., Cipriani, R., Sabbatini, P., and Denton, A. (1991). Adenovirus E1B 19-kilodalton protein overcomes the cytotoxicity of E1A proteins. *J Virol* 65, 2968-78.
- Whyte, P. (1995). The retinoblastoma protein and its relatives. *Semin Cancer Biol* 6, 83-90.
- Wienzek, S., Roth, J., and Dobbelstein, M. (2000). E1B 55-kilodalton oncoproteins of adenovirus types 5 and 12 inactivate and relocalize p53, but not p51 or p73, and cooperate with E4orf6 proteins to destabilize p53. *J Virol* 74, 193-202.
- Williams, J., Williams, M., Liu, C., and Telling, G. (1995). Assessing the role of E1A in the differential oncogenicity of group A and group C human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 199, 149-75.
- Wilson, V. G., and Rangasamy, D. (2001). Intracellular targeting of proteins by sumoylation. *Exp Cell Res* 271, 57-65.
- Wilson, V. G., and Rangasamy, D. (2001). Viral interaction with the host cell sumoylation system. *Virus Res* 81, 17-27.
- Wolff, B., Sanglier, J. J., and Wang, Y. (1997). Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem Biol* 4, 139-47.
- Woods, D. B., and Vousden, K. H. (2001). Regulation of p53 function. *Exp Cell Res* 264, 56-66.
- Wu, W. S., Vallian, S., Seto, E., Yang, W. M., Edmondson, D., Roth, S., and Chang, K. S. (2001). The growth suppressor PML represses transcription by functionally and physically interacting with histone deacetylases. *Mol Cell Biol* 21, 2259-68.
- Wu, X., and Levine, A. J. (1994). p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3602-6.
- Xiao, H., Pearson, A., Coulombe, B., Truant, R., Zhang, S., Regier, J. L., Triezenberg, S. J., Reinberg, D., Flores, O., Ingles, C. J., and et al. (1994). Binding of basal transcription factor TFIIH to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Mol Cell Biol* 14, 7013-24.
- Xirodimas, D. P., Stephen, C. W., and Lane, D. P. (2001). Cocompartmentalization of p53 and Mdm2 is a major determinant for Mdm2-mediated degradation of p53. *Exp Cell Res* 270, 66-77.
- Yeh, E. T., Gong, L., and Kamitani, T. (2000). Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene* 248, 1-14.
- Yew, P. R., and Berk, A. J. (1992). Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature* 357, 82-85.
- Yew, P. R., Kao, C. C., and Berk, A. J. (1990). Dissection of functional domains in the adenovirus 2 early 1B 55K polypeptide by suppressor-linker insertional mutagenesis. *Virology* 179, 795-805.
- Yew, P. R., Liu, X., and Berk, A. J. (1994). Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. *Genes Dev* 8, 190-202.
- Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1999). Trichostatin and leptomycin. Inhibition of histone deacetylation and signal-dependent nuclear export. *Ann N Y Acad Sci* 886, 23-36.
- Yuan, W., and Krug, R. M. (2001). Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *Embo J* 20, 362-71.
- Zambetti, G. P., Bargonetti, J., Walker, K., Prives, C., and Levine, A. J. (1992). Wild-type p53 mediates positive regulation of gene expression through a specific DNA sequence element. *Genes Dev* 6, 1143-52.
- Zantema, A., Fransen, J. A., Davis Olivier, A., Ramaekers, F. C., Vooijs, G. P., DeLeys, B., and Van der Eb, A. J. (1985). Localization of the E1B proteins of adenovirus 5 in transformed cells, as revealed by interaction with monoclonal antibodies. *Virology* 142, 44-58.

- Zantema, A., Schrier, P. I., Davis Olivier, A., van Laar, T., Vaessen, R. T., and van der, E. A.** (1985). Adenovirus serotype determines association and localization of the large E1B tumor antigen with cellular tumor antigen p53 in transformed cells. *Mol Cell Biol* 5, 3084-91.
- Zhan, Q., Fan, S., Bae, I., Guillouf, C., Liebermann, D. A., O'Connor, P. M., and Fornace, A. J., Jr.** (1994). Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene* 9, 3743-51.
- Zhang, S., Mak, S., and Branton, P. E.** (1992). Overexpression of the E1B 55-kilodalton (482R) protein of human adenovirus type 12 appears to permit efficient transformation of primary baby rat kidney cells in the absence of the E1B 19-kilodalton protein. *J Virol* 66, 2302-09.
- Zhong, S., Muller, S., Ronchetti, S., Freemont, P. S., Dejean, A., and Pandolfi, P. P.** (2000). Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* 95, 2748-52.

VERÖFFENTLICHUNGEN

- 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*, Sep 25; 98 (20):11312-7.
- Endter, C, and Dobner, T, 2002: Transformation by Human Adenoviruses (Review). *Curr Top Microbiol Immunol*, in Vorbereitung (eingereicht).
- Endter, C, Hauber, J, Dobner, T, 2002: Intranuclear targeting of Ad5 E1B-55kDa is a prerequisite for efficient transformation of primary rodent cells. *Mol Cell Biol*, in Vorbereitung (eingereicht).

VORTRÄGE

- Endter, C, Hauber, J, Dobner, T, 2002: Intranuclear targeting of Ad5 E1B-55kDa is a prerequisite for efficient transformation of primary rodent cells. *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (Erlangen, 2002)*.
- 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. *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (Dresden, 2001)*.
- 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. *Small DNA Tumor Virus Meeting (Cambridge, England, 2001)*.
- Endter C, Stauber R, Dobner T, 2000: Nuclear export is required for transformation by adenovirus type 5 1B 55-kDa oncoprotein. *Small DNA Tumor Virus Meeting (Madison/Wisconsin, 2000)*.

POSTERPRÄSENTATION

- Endter C, Stauber R, Dobner T, 2000: Nuclear export is required for transformation by adenovirus type 5 1B 55-kDa oncoprotein. *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (Wien, 2000)*.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Januar 1999 und April 2002 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg angefertigt.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Thomas Dobner für die Bereitstellung des Themas and die Möglichkeit, von dem reichen Methodenspektrum seiner Arbeitsgruppe profitieren zu können. Seine zahlreichen motivierenden Ideen and Anregungen haben zum Gelingen der Arbeit entscheidend beigetragen. Auch danke ich Ihm für die Möglichkeit, meine Ergebnisse auf zahlreichen Tagungen zu präsentieren.

Herrn Prof. Dr. Hans Wolf danke ich für die Bereitstellung eines optimal ausgestatteten Arbeitsplatzes and die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Eggehard Holler danke ich für die bereitwillige Betreuung der Arbeit and die Bereitschaft zur Übernahme des Erstgutachtens.

Besonders danken möchte ich auch Herrn Dr. Thilo Spruss für die permanente Bereitstellung von Ratten and Nacktmäusen. In diesem Zusammenhang danke ich auch Herrn Franz Wiesenmeyer and Herrn Oskar Baumann für die hervorragende technische Assistenz. Josef Köstler and Holger Melzl danke ich für die Durchführung der DNA-Sequenzierungen, Frau Dagmar Büchner für die ständige Hilfsbereitschaft im Laboralltag.

Außerdem danke ich allen Laborkollegen and Praktikanten, die mich bei der Anfertigung der Doktorarbeit unterstützt haben. Besonderer Dank gilt Frau Dr. Julia Kzhyshkowska, die mir nicht nur bei fachlichen Problemen zur Seite stand.

Auch bei Dr. Kerstin Püllmann möchte ich mich an dieser Stelle für das Korrekturlesen der Arbeit bedanken.

Desweiteren danke ich zahlreichen Freunden and Verwandten (Bernie, Schaffi, Diana, Katharina, M.-Clique), die für den notwendigen seelischen Ausgleich sorgten.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Mutter, bei meinen Schwiegereltern and besonders bei meiner Frau Monika bedanken, ohne deren Hilfe and Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Monika ist diese Arbeit gewidmet.

