

Analysen zum onkogenen Potenzial
des E1B-55K-Proteins von
Adenovirus Typ 5



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

vorgelegt von
Barbara Härtl
aus Hofteich

Dezember 2005

Die vorliegende Arbeit wurde selbstständig
und ohne unzulässige Hilfe angefertigt.

Barbara Härtl

Promotionsgesuch eingereicht am: 15.12.2005

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Eggehard Holler und PD. Dr. Thomas Dobner

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Jürgen Heinze (Vorsitzender)
Prof. Dr. Eggehard Holler (1. Prüfer, Erstgutachten)
PD Dr. Thomas Dobner (2. Prüfer, Zweitgutachten)
Prof. Dr. Karl Kunzelmann (3. Prüfer)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	V
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 <i>Adenoviren</i>	3
2.1.1 Klassifikation	3
2.1.2 Struktur und Genomorganisation	4
2.1.3 Produktiver Infektionszyklus	6
2.2 <i>Transformation und Onkogenität humaner Adenoviren</i>	8
2.2.1 Onkogenes Potenzial humaner Adenoviren	8
2.2.2 Transformation von Nagetierzellen in Gewebekultur	9
2.2.3 Transformation humaner Zellen in Kultur	10
2.2.4 Persistenz und DNA-Integration	11
2.2.5 Struktur und Funktion adenoviraler Onkoproteine	12
2.2.5.1 E1-Region	12
2.2.5.1.1 E1B-55K	14
2.2.5.2 E4-Region	17
2.3 <i>PML-NBs</i>	20
2.3.1 Generelle Eigenschaften der PML-NBs	20
2.3.2 Komponenten und Funktionen der PML-NBs	20
2.3.3 Wechselwirkungen verschiedener Viren mit den PML-NBs	24
2.4 <i>Aufgabenstellung</i>	26
3 Material	28
3.1 <i>Zellen</i>	28
3.1.1 Bakterienstämme	28
3.1.2 Säugerzellen	28
3.2 <i>Nukleinsäuren</i>	29
3.2.1 Oligonukleotide	29
3.2.2 Vektoren	30
3.2.3 Rekombinante Plasmide	31
3.3 <i>Antikörper</i>	32
3.3.1 Primärantikörper	32

3.3.2	Sekundärantikörper	33
3.4	<i>Größen- und Molekulargewichtsstandards</i>	33
3.5	<i>Kommerzielle Systeme</i>	34
3.6	<i>Tiere</i>	34
3.7	<i>Enzyme und Reagenzien</i>	34
3.8	<i>Chemikalien und Verbrauchsmaterial</i>	35
3.9	<i>Computerprogramme und Datenbanken</i>	35
4	Methoden	36
4.1	<i>Bakterien</i>	36
4.1.1	Kulturbedingungen und Lagerung	36
4.1.2	Transformation von <i>E. coli</i>	37
4.1.2.1	Transformation durch Elektroporation	37
4.2	<i>Säugerzellen</i>	38
4.2.1	Kulturbedingungen und Lagerung von Säugerzellen	38
4.2.1.1	Kultivierung von etablierten Säugerzellen als Einschichtkulturen	38
4.2.1.2	Gewinnung und Kultivierung primärer Rattennierenzellen	39
4.2.1.3	Lagerung von Säugerzellen	40
4.2.2	Bestimmung der Gesamt-Zellzahl	40
4.2.3	Transfektion von Säugerzellen	41
4.2.3.1	Kalziumphosphat-Methode	41
4.2.3.2	Liposomenmethode	42
4.2.4	Transformation primärer Zellen	42
4.2.5	Etablierung stabil transformierter Zelllinien	43
4.2.6	Ernte von Säugerzellen	43
4.3	<i>DNA-Techniken</i>	44
4.3.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	44
4.3.2	Präparation genomischer DNA aus kultivierten Zellen	45
4.3.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	45
4.3.4	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	45
4.3.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	46
4.3.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	47
4.3.7	Klonierung von DNA-Fragmenten	48
4.3.7.1	Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme	48
4.3.7.2	Ligation und Transformation	48
4.3.7.3	Identifizierung rekombinanter Klone	49
4.3.8	DNA-Sequenzierung	49

4.4	<i>Protein-Techniken</i>	50
4.4.1	Expression rekombinater Proteine in <i>E. coli</i>	50
4.4.2	Gesamtzellextrakt aus Säugerzellen	52
4.4.3	Quantitative Bestimmung von Proteinkonzentrationen	52
4.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	53
4.4.5	<i>Western Blot</i>	54
4.4.6	Immunpräzipitation	56
4.4.7	Immunfluoreszenz	58
4.4.7.1	Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA)	58
4.4.7.2	Fixierung mit Methanol	59
4.4.7.3	Immunologischer Nachweis	59
4.4.8	Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen den C-Terminus von E1B-55K	60
4.5	<i>Reporterversuche</i>	60
4.6	<i>Tumorigenitätstest in Nacktmäusen</i>	62
5	Ergebnisse	63
5.1	<i>Analyse des nukleären Exports von E1B-55K im Kontext der Zelltransformation</i>	63
5.1.1	E1B-55K pendelt in primären Rattennierenzellen	64
5.1.2	Die Inhibition der Kernexportfunktion steigert das transformierende Potenzial von E1B-55K in primären BRK-Zellen und die Repression der p53-Transaktivierung	66
5.1.3	Die zytoplasmatische Sequestration von p53 ist unabhängig von der Kernexportfunktion des E1B-55K-Proteins	69
5.1.4	Das E1B-NES-Protein induziert die Umverteilung von nukleären PML-NBs in stabil transformierten BRK-Zellen	71
5.1.5	Das E1B-NES-Protein steigert die Tumorigenität transformierter BRK-Zellen in immundefizienten Nacktmäusen	75
5.2	<i>Identifizierung eines p53-unabhängigen Mechanismus im Ad5 E1B-55K-vermittelten Transformationsprozess</i>	78
5.2.1	Funktionelle Domänen in E1B-55K	78
5.2.2	Mutationen in der BC-Box und RING-Fingerdomäne verringern das transformierende Potenzial von Ad5 E1B-55K	80
5.2.3	Mutationen in der RING-Fingerdomäne haben keinen Einfluss auf die transkriptionsreprimierenden Funktionen des E1B-55K-Proteins	82
5.2.3.1	Reportergenversuche mit p53-abhängigen Promotoren	82
5.2.3.2	Reportergenversuche mit p53-unabhängigem Promotor	86
5.2.4	Mutationen in der RING-Fingerdomäne verändern die subzelluläre Lokalisation von E1B-55K in stabil transformierten BRK-Zellen	89
5.2.5	Mutationen in der RING-Fingerdomäne verhindern die Ausbildung p53/PML-positiver subnukleärer Aggregate	91

5.2.6	Mutationen in der RING-Fingerdomäne verhindern nicht die Wechselwirkung mit PML und daxx in stabil transformierten BRK-Zellen	93
5.2.7	Mutationen in der RING-Fingerdomäne verhindern die Bindung von E1B-55K an Mre11	96
5.2.8	Ad5 E1B-55K sequestriert Mre11 in den perinukeären Proteinkomplex	97
5.2.9	Mutationen in der RING-Fingerdomäne verhindern den proteolytischen Abbau von Mre11 in Kooperation mit Ad5 E4orf6	100
5.2.10	Mutationen in der RING-Fingerdomäne verändern den transformierten Zellphänotyp	102
5.2.10.1	Einfluss auf die Zellteilungsraten	102
5.2.10.2	Einfluss auf das Zytoskelett	104
6	Diskussion	107
6.1	<i>Adenovirus-vermittelte Transformation</i>	107
6.2	<i>Die Rolle des nukleären Exports bei der Transformation</i>	109
6.2.1	Der CRM1-vermittelte Kernexport von E1B-55K ist nicht notwendig für die Transformation und die Inhibition der p53-Transaktivierung	109
6.2.2	Die Inhibition des Kernexports von E1B-55K führt zur Sequestrierung von PML-NBs	110
6.2.3	Die zytoplasmatische Sequestration von p53 ist unabhängig vom CRM1-vermittelten Kernexport von E1B-55K	112
6.3	<i>Der Einfluss der BC-Box und RING-Fingerdomäne auf das transformierende Potenzial von E1B-55K</i>	114
6.3.1	Die transformierenden Eigenschaften von E1B-55K umfassen p53-abhängige und p53-unabhängige Funktionen	115
6.3.2	Ad5 E1B-55K bindet in transformierten Zellen an Mre11 und verschiedene PML-Isoformen	117
6.3.3	Mutationen in der BC-Box führen zu einem neutralen Phänotyp oder verringern stark die Stabilität von Ad5 E1B-55K	118
6.3.4	Die Mutation in der RING-Fingerdomäne verändert die subzelluläre Verteilung von Ad5 E1B-55K	120
6.3.5	Die Bindung von Ad5 E1B-55K an Mre11 trägt zur vollständigen Transformation von BRK-Zellen bei	120
6.3.6	Die mögliche Rolle der Wechselwirkung von Ad5 E1B-55K mit Mre11 in der Transformation	121
6.3.7	Die Modulation der PML-NBs ist wichtig für die transformierenden Eigenschaften von Ad5 E1B-55K	124
7	Literaturverzeichnis	128
	Veröffentlichungen	152
	Danksagung	153

Abkürzungen

Ad2, Ad5 usw.	Adenovirus Serotyp 2, 5 usw.
bid	bidest
BRK-Zellen	Rattennierenzellen (<i>baby rat kidney cells</i>)
DAPI	4',6-Diamidin-2'-Phenylindol Dihydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
NTP	Desoxynukleosid-5'-Triphosphate
E1, 2, 3, 4	frühe Region 1, 2, 3, 4 (<i>early region 1, 2, 3, 4</i>)
E1B-55K	55KDa Produkt der frühen Region E1 von Adenovirus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH _{75%}	75% (v/v) Ethanol in H ₂ O _{bid}
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FKS	fötale Kälberserum
kb	Kilobasen
kBp	Kilobasenpaar
KDa	Kilodalton
L1, 2, 3, 4, 5	späte Region 1, 2, 3, 4, 5 (<i>late region 1, 2, 3, 4, 5</i>)
MLP	<i>major late promotor</i>
MLTU	<i>major late transcription unit</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NES	nukleäres Exportsignal
OD	Optische Dichte
orf	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PML	Protein der promyelozytischen Leukämie
PML-NB	<i>PML nuclear body</i>
POD	<i>PML oncogenic domain</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>s.e.m</i>	<i>standard error of the mean</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SKM	SUMO1-Konjugationsmotiv
SUMO1	<i>small ubiquitin-related modifier 1</i>
U	<i>unit</i> (Aktivitätseinheit von Enzymen)
UpM	Umdrehungen pro Minute
(v/v)	Volumeneinheit pro Gesamtvolumen (<i>volume per volume</i>)
Vol.	Volumeneinheit
(w/v)	Gewichtseinheit pro Gesamtvolumen (<i>weight per volume</i>)

1 Zusammenfassung

Das 55-kDa Genprodukt der frühen Region 1B (E1B-55K) von Adenovirus Serotyp 5 (Ad5) ist ein multifunktionelles Phosphoprotein, das eine zentrale Rolle im Ad5-vermittelten Transformationsvorgang primärer Zellen einnimmt. Den onkogenen Aktivitäten des E1B-Proteins liegen verschiedene Wirkmechanismen zugrunde. An erster Stelle steht dabei die Inaktivierung des zellulären Tumorsuppressorproteins p53 auf der Ebene der Transkription. Als weitere Faktoren werden schon seit längerem eine intrinsische Kernexportaktivität und posttranslationale Funktionen vermutet, die über unterschiedliche Bereiche im viralen Polypeptid reguliert werden. Soweit bekannt, handelt es sich dabei um ein Leucin-reiches Kernexportsignal (NES) sowie um zwei hoch konservierte Sequenzmotive, die große Übereinstimmung zu sog. BC-Boxen oder atypischen RING-Fingerdomänen aufweisen.

Vor dem Hintergrund dieser Beobachtungen wurden in der vorliegenden Arbeit weiterführende Untersuchungen zur Funktion des NES, der BC-Box und der RING-Fingerdomäne im E1B-55K-induzierten Transformationsvorgang durchgeführt. Im Mittelpunkt der Arbeiten standen verschiedene Mutanten des E1B-Proteins, die definierte Aminosäureaustausche in den entsprechenden Sequenzmotiven enthalten. Durch klassische Transformationsexperimente auf der Basis primärer Rattenepithelzellen gelang zunächst der Nachweis, dass die Kernexportfunktion des E1B-Proteins für seine transformierenden und onkogenen Eigenschaften nicht essenziell ist. Vielmehr zeigen die erzielten Ergebnisse, dass die Inhibition des Kernexportvorgangs die Transformationsrate und Tumorigenität der transformierten Zellen deutlich steigert. Die erhöhte *Focus*-Bildung und Tumorigenität der Zellen korreliert mit einem signifikanten Anstieg der E1B-vermittelten Repression p53-stimulierter Transkription, der vollständigen Umverteilung von p53 und PML-NB-Kerndomänen in große Proteinaggregate und der Bindung von E1B-55K an die PML-NB-Komponenten daxx und PML. Diese Beobachtungen zeigen erstmalig, dass die Wechselwirkung von E1B-55K mit daxx und PML und die damit verbundene Modulation der PML-NB-Kerndomänen einen wichtigen Schritt in E1B-induzierten Transformationsprozess darstellen.

Diese Annahme wird durch die Untersuchungen zur Funktion der BC-Box und RING-Fingerdomäne unterstützt. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass bestimmte Aminosäureaustausche in der BC-Box (E1B-BC1) oder in der RING-Fingerdomäne (E1B-RF6) die Transformationsrate deutlich reduzieren. Dabei korreliert der Phänotyp der BC1-Mutante mit dem Verlust der Inhibition p53-stimulierter Transkription in Reporteranalysen. Im Gegensatz dazu wird die Repression von p53 durch die Mutationen in E1B-RF6 kaum beeinträchtigt. Dieser Befund ist hoch interessant, da er erstmals eine p53-unabhängige Funktion des E1B-Proteins im Ad5-vermittelten Transformationsprozess aufzeigt. Auf molekularer Ebene wird diese Aktivität höchstwahrscheinlich über die Wechselwirkung mit dem zellulären PML-NB-assoziierten Protein Mre11 vermittelt, das bekanntermaßen eine zentrale Rolle in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen spielt. Interessanterweise verhindern die Mutationen in E1B-RF6 neben der Bindung an Mre11 auch die Umverteilung von PML-NBs und p53 in subnukleäre Proteinaggregate. Dies lässt vermuten, dass E1B-55K die Funktion und Lokalisation von PML-NBs bzw. PML-NB-assoziierten Komponenten über die Bindung an Mre11 moduliert. Ob und in welchem Umfang E1B-55K dabei die Mre11-regulierten Prozesse der DNA-Reparatur und Telomer-Erhaltung verändert, ist noch unklar. Erste Untersuchungen in diese Richtung weisen jedoch darauf hin, dass möglicherweise eine Funktion von Mre11 verändert wird, die im Zusammenhang mit der Zellzykluskontrolle bei G2/M-Phasenübergang stehen könnte.

Im Ganzen zeigen diese Ergebnisse dieser Arbeit erstmals, dass Ad5 E1B-55K über p53-abhängige und -unabhängige Mechanismen zur vollständigen Transformation primärer Zellen beiträgt. Letztere Aktivität wird zumindest teilweise über die Wechselwirkung mit Mre11 und über die Modulation von PML-NBs bzw. den PML-NB-assoziierten Komponenten durch PML reguliert. Da alle bislang untersuchten DNA- und RNA-Tumorviren Genprodukte besitzen, die die Integrität von PML-NBs verändern, könnte die Bindung an Mre11 und die Mre11-abhängige Modulation von PML-NBs durch E1B-55K einen allgemein gültigen Mechanismus virusinduzierter Onkogenese darstellen.

2 Einleitung

2.1 Adenoviren

2.1.1 Klassifikation

Adenoviren wurden erstmals zu Beginn der fünfziger Jahre aus adenoidem Gewebe und dem Rachensekret respiratorisch erkrankter Personen isoliert (Rowe *et al.*, 1953; Hilleman und Werner, 1954). Die ersten Virusisolate wurden als *adenoid degeneration* (AD), *respiratory illness* (RI), *adenoidal-pharyngeal-conjunctival* (APC) oder *acute respiratory disease* (ARD) bezeichnet. Aufgrund gemeinsamer Merkmale und Eigenschaften fasste man sie später zur Gruppe der Adenoviren zusammen (Huebner *et al.*, 1954; Enders *et al.*, 1956).

Die Familie der *Adenoviridae* umfasst derzeit über 100 verschiedene, serologisch unterscheidbare Virustypen, die wiederum in vier Gattungen eingeteilt werden: zwei Gattungen (*Mastadenovirus* und *Aviadenovirus*) stammen aus Säugetieren bzw. aus Vögeln, die anderen beiden Gattungen (*Atadenovirus* und *Siadenovirus*) zeichnen sich durch ein breiteres Wirtsspektrum aus. Atadenoviren infizieren verschiedene Wiederkäuer, Vögel und Reptilien sowie eine Beuteltierart und wurden auf Grund ihres hohen A+T-Gehalts benannt. Die zwei bekannten Siadenoviren wurden aus Vögeln und einer Froschart isoliert (zur Übersicht: Davison *et al.*, 2003 und enthaltene Literatur).

Basierend auf der Onkogenität im immunkompetenten Versuchstier und einer Reihe weiterer Kriterien (Hämagglutination, GC-Gehalt und Sequenzhomologien der viralen DNA) werden die humanen Adenoviren in sechs Subgruppen (A-F) unterteilt (zur Übersicht: Graham, 1984; Modrow und Falke, 1997; Shenk, 2001). Humane Adenoviren sind weltweit mit hoher Prävalenz verbreitet und sind mit einer Vielzahl klinischer Symptome assoziiert. Sie verursachen sowohl lytische als auch persistierende Infektionen. Obwohl sie hauptsächlich harmlose Erkrankungen auslösen, treten sie auch als Erreger von schweren Krankheiten wie Keratokon-

junktivitis, Pneumonie, Bronchitis, Gastroenteritis, Zystitis, persistierender Harnwegsinfektionen, Hepatitis und Meningoenzephalitis auf. In seltenen Fällen können Adenovirusinfektionen bei immunsupprimierten Personen auch zum Tode führen (zur Übersicht: Horwitz, 1996; Modrow und Falke, 1997).

2.1.2 Struktur und Genomorganisation

Adenoviren bestehen aus einem 80-110 nm großen ikosaedrischen Proteinkapsid ohne Membranhülle und enthalten ein lineares doppelsträngiges DNA-Genom. Die 252 Untereinheiten des Kapsids setzen sich aus 240 Hexonen und 12 Pentonen zusammen (Abb. 1; Stewart *et al.*, 1993). Die eckständigen Pentone sind nicht-kovalent mit Fiberproteinen verknüpft und bilden ein Charakteristikum der Adenoviruskapside, die antennenartigen Fortsätze (*spikes*). Diese ermöglichen die Adsorption des Virus an den Rezeptor der Wirtszelle (Bergelson *et al.*, 1997). Zur Aufnahme des Virus in die Zellen durch Rezeptor-vermittelte Endozytose spielt auch das Pentonbasisprotein eine wichtige Rolle, welches den Kontakt zu den Integrinen der Zelloberfläche herstellt (Wickham *et al.*, 1993; Wickham *et al.*, 1994; Mathias *et al.*, 1994).

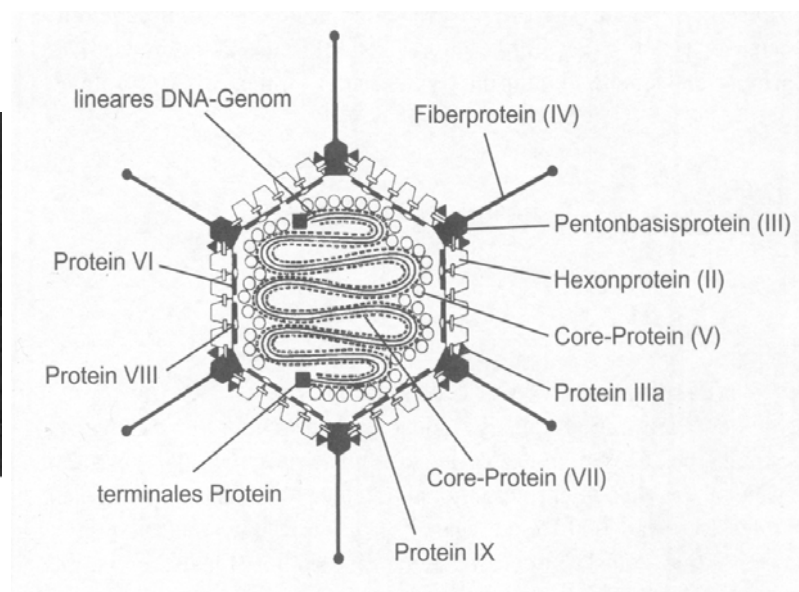
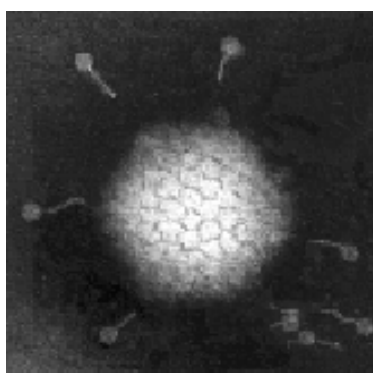


Abb. 1 Schematische Darstellung eines Adenovirus

In der linken Abbildung ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Adenovirus dargestellt. Zu erkennen ist das ikosaedrische Kapsid mit den Fiberproteinen. Die rechte Darstellung zeigt einen schematischen Querschnitt durch das Adenovirus-Partikel (Modrow und Falke, 1997)

Das Genom der Adenoviren besteht aus 26 – 45 kBp und ist durch invertierte terminale Sequenzwiederholungen (*inverted terminal repeat*, ITR) charakterisiert. An beiden 5`-Enden des viralen Genoms ist je ein terminales Protein (TP) gebunden, welches zur Initiation der viralen DNA-Replikation benötigt wird (zur Übersicht: Davison *et al.*, 2003).

Zu den heute am ausführlichsten untersuchten humanen Adenoviren gehören die nah verwandten Serotypen 2 und 5 (Ad2 und Ad5) der Subgruppe C. Die Genome von Ad2 und Ad5 enthalten neun Transkriptionseinheiten (Abb. 2), die für etwa 40 verschiedene regulatorische und strukturelle Proteine und zwei virusassoziierte RNAs (VA RNAs) kodieren. Sequenzvergleiche mit anderen Serotypen zeigen, dass alle humanen Adenoviren eine ähnliche Genomorganisation besitzen und nahezu die gleichen Genprodukte exprimieren (zur Übersicht: Shenk, 2001). Die Genprodukte der E1-, E3- und E4-Region sind unter den verschiedenen Vertretern der *Adenoviridae* nicht oder nicht in allen Gattungen konserviert. Diese Unterschiede der verschiedenen Gattungen werden als Anpassung an die jeweiligen Wirte verstanden (Davison *et al.*, 2003).

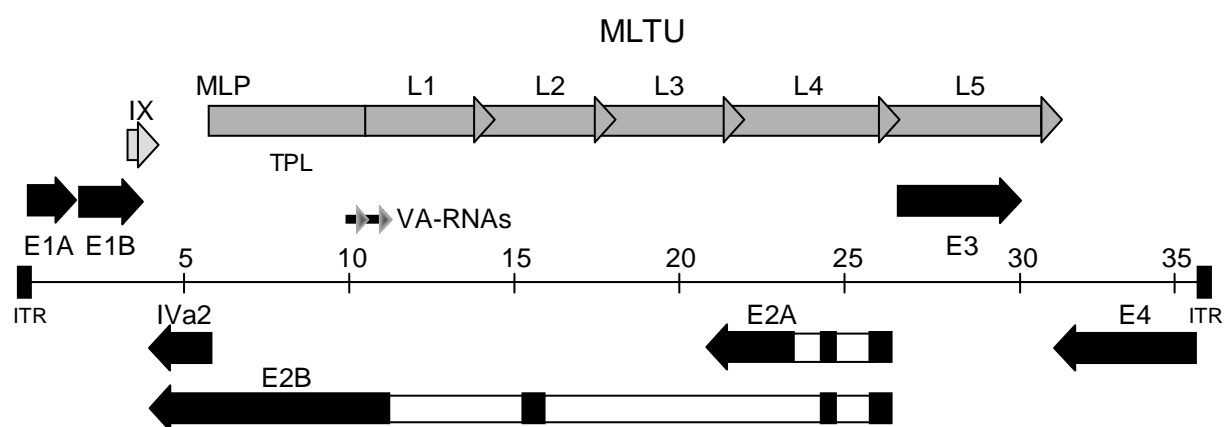


Abb. 2 Die Genomorganisation von Adenovirus Serotyp 5

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

transcription unit; MLP: major late promoter; TPL: tripartite leader; VA RNAs: virus-associated RNAs; ITR: inverted terminal repeat.

2.1.3 Produktiver Infektionszyklus

Humane Adenoviren infizieren *in vivo* ein großes Spektrum unterschiedlicher Zelltypen wie z. B. Epithelzellen des Hals-, Nasen-, Rachenraumes, der Lunge und des Verdauungstraktes. Adenoviren können sich teilende, aber auch differenzierte Zellen infizieren. Bevorzugte Zielzellen sind jedoch vor allem post-mitotisch ruhende, terminal differenzierte Zellen der Schleimhäute. In Gewebekultur können Adenoviren in verschiedenen Tumorzelllinien und primären Zellen vermehrt werden. Während sie in vielen humanen Zellen einen produktiven (lytischen) Vermehrungszyklus durchlaufen, resultieren Infektionen von Zellen tierischen Ursprungs meist in einem abortiven Infektionsverlauf (zur Übersicht: Modrow und Falke, 1997; Shenk, 2001).

Der produktive Infektionszyklus wird in eine frühe und eine späte Phase unterteilt, die *per definitionem* durch das Einsetzen der viralen DNA-Synthese getrennt sind. Die frühe Phase der Infektion beginnt mit der Interaktion des Virus mit der Wirtszelle und umfasst Adsorption, Penetration und Kernimport des viralen DNA-Protein-Komplexes. Anschließend erfolgt die Transkription und Translation von mehr als 20 regulatorischen Proteinen der frühen Transkriptionseinheiten E1A, E1B, E2, E3 und E4 in einer zeitlich koordinierten Reihenfolge. Ziel ist die Schaffung optimaler Bedingungen für die Virusreplikation und die Produktion viraler Strukturproteine in der späten Phase der Infektion. Vor allem der Eintritt ruhender Zellen in die S-Phase und die Zellzyklusprogression durch die E1A- und E1B-Proteine ist für die virale Replikation essentiell, da den Viren nur in sich teilenden Zellen ein genügend großer Vorrat an Molekülbausteinen zur Verfügung steht. Zusätzlich blockieren Proteine der E1B- und E3-Region verschiedene antivirale Schutzmechanismen der Wirtszelle, wie z. B. Apoptose und modulieren die Immunantwort, so dass das Erkennen und vorzeitige Eliminieren von virusinfizierten Zellen durch das Immunsystem des Wirtsorganismus verhindert wird (zur Übersicht: Gooding und Wold, 1990;

Gooding, 1992; Burgert und Blusch, 2000; Horwitz, 2001). Die frühe Transkriptionseinheit E2 kodiert für Proteine, die für die Replikation der viralen DNA essentiell sind. Dazu gehören u. a. die viruseigene DNA-Polymerase, das DNA-bindende Protein (DBP; E2A-72KDa) und das terminale Protein (TP; zur Übersicht: Shenk, 2001). Die E4-Proteine besitzen vielfältige Funktionen, die für eine effiziente virale Replikation benötigt werden (zur Übersicht: Täuber und Dobner, 2001b).

Mit dem Einsetzen der viralen DNA-Replikation beginnt die späte Phase des lytischen Infektionszyklus, die durch die Aktivierung der späten Transkriptionseinheit (MLTU, *major late transcription unit*) gekennzeichnet ist. Durch differenzielles Spleißen des Primärtranskripts entstehen fünf Gruppen verschieden langer mRNAs (L1 bis L5), die hauptsächlich für Strukturproteine des ikosaedrischen Kapsids kodieren. Alle 18 gebildeten mRNAs besitzen einen gemeinsamen 5'-nicht-kodierenden Bereich, der als *tripartite leader* (TPL) bezeichnet wird. Wesentlicher Bestandteil der späten Phase ist das Abschalten der zellulären Proteinsynthese (*host shut-off*) durch die Inaktivierung des *Cap-binding* Komplexes eIF4F, während virale mRNAs *Cap*-unabhängig weiter translatiert werden (Dolph *et al.*, 1988). Nach der Synthese aller viralen Bausteine für die Bildung der Nachkommenviren, werden mit Hilfe von Chaperonen die Kapsomere im Zytoplasma zusammengesetzt. In Gewebekultur endet der produktive Replikationszyklus nach etwa 24 Stunden mit dem Absterben der Wirtszelle, wobei je nach Serotyp bis zu 10000 Viruspartikel produziert werden (zur Übersicht: Modrow und Falke, 1997; Shenk, 2001).

2.2 Transformation und Onkogenität humaner Adenoviren

2.2.1 Onkogenes Potenzial humaner Adenoviren

Zwischen der Entstehung menschlicher Tumorerkrankungen und humanen Adenoviren konnte bis heute kein Zusammenhang hergestellt werden (Mackey *et al.*, 1976; Wold *et al.*, 1979; Mackey *et al.*, 1979; Chauvin *et al.*, 1990). Sie waren jedoch die ersten humanpathogenen Viren, für die kanzerogene Eigenschaften im Tiermodell nachgewiesen werden konnten. Ihre Einstufung als DNA-Tumorviren beruht auf ihrer Fähigkeit nach Inokulation in neugeborenen Nagern Tumoren zu induzieren. Bereits 1962 zeigten Trentin und Mitarbeiter, dass das Adenovirus Serotyp 12 (Ad12) onkogene Eigenschaften in neugeborenen Hamstern aufweist (Trentin *et al.*, 1962). In weiteren Arbeiten wurden verschiedene Serotypen auf ihre Fähigkeit getestet, im heterologen, semipermissiven Tiersystem Tumore induzieren zu können. Abhängig von der Effizienz und Latenzzeit der Tumorinduktion wurden sie daraufhin in die drei Subgruppen nicht onkogen, schwach onkogen oder hoch onkogen unterteilt (Tab. 1). Onkogenes Potenzial konnte nur für bestimmte Serotypen (12, 18, 31) nachgewiesen werden (zur Übersicht: Graham, 1984). Diese Viren gelten als hoch onkogen und induzieren mit sehr großer Effizienz und kurzer Latenzzeit Tumoren in Nagetieren. Serotypen, bei denen nur unregelmäßig und mit langen Inkubationszeiten eine Tumorinduktion beobachtet werden kann, werden als schwach onkogen eingestuft. Viren der Subgruppe C-F werden bis heute als nicht onkogen eingestuft. Einzige Ausnahme bilden jedoch die Serotypen 9 und 10 der Subgruppe D, welche östrogenabhängige Mammakarzinome in den Brustdrüsen weiblicher Ratten induzieren (Ankerst *et al.*, 1974a; Ankerst *et al.*, 1974b; Jonsson und Ankerst, 1977; Ankerst und Jonsson, 1989; Javier *et al.*, 1991).

Tab. 1 Übersicht hoch onkogener, schwach und nicht onkogener Adenoviren

ONKOGENITÄT IN TIEREN	SUBGRUPPE	SEROTYPEN	ART DES TUMORS
hoch onkogen	A	12, 18, 31	undifferenzierte Sarkome
	D	9, 10	Fibroadenome
schwach onkogen	B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35	undifferenzierte Sarkome
nicht onkogen	C - F	C (1, 2, 5, 6); D (8, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49); E (4); F (40, 41)	keine

2.2.2 Transformation von Nagetierzellen in Gewebekultur

Ungeachtet ihres Potenzials, Tumoren in Nagetieren zu erzeugen, sind alle bisher getesteten humanen Adenoviren der verschiedenen Subgruppen, sowohl onkogene als auch nicht onkogene, in der Lage, Nagetierzellen in Gewebekultur zu transformieren (zur Übersicht: Nevins und Vogt, 1996). Dabei werden die transformierten Zellen morphologisch so verändert, dass sie durch Verlust der Kontaktinhibition und der Verankerungsfähigkeit als dichte und vielschichtige Kolonien (*Foci*) auswachsen und verschiedene phänotypische Merkmale onkogener Transformation aufweisen. Der Grad der Tumorigenität der transformierten Zellen ist jedoch wiederum abhängig vom Virustyp und dem Immunsystem des Versuchstieres (Graham, 1984; Williams *et al.*, 1995; Shenk, 2001). So können nicht alle dieser transformierten Zelllinien nach Inokulation in Nagetiere Tumoren erzeugen. Im Gegensatz zu Ad12-transformierten Zellen, die in syngenem, immunkompetenten Ratten Tumorwachstum induzieren, können durch Ad2- oder Ad5-transformierte Zellen normalerweise keine Tumoren in Ratten gebildet werden. Allerdings können Ad2-/Ad5- und Ad12-transformierte Zellen in immunsupprimierten (thymusdefizienten) Nacktmäusen, denen die MHC-Klasse I-restringierten zytotoxischen T-Zellen (CTL) fehlen, Tumoren induzieren (Bernards *et al.*, 1983). Dies zeigt, dass die Tumorigenität von Adenovirus-transformierten Zellen

hauptsächlich von den thymusabhängigen CTL-Komponenten des Immunsystems der Wirtstiere beeinflusst wird (Raska und Gallimore, 1982; Bernards *et al.*, 1983; Cook und Lewis, 1987). Obwohl die molekularen Grundlagen der Transformationsfähigkeit bei Nagetierzellen noch weitgehend unbekannt sind (Hutton *et al.*, 2000; Shenk, 2001), deutet die Anwesenheit der E1-Onkoproteine in allen Ad- und Plasmid-transformierten Zellen darauf hin, dass die Integration der E1-Region in das Wirtszellgenom eine Voraussetzung für die Initiation der Transformation der Zellen sein könnte. Neueren Daten zufolge muss aber auch die Möglichkeit zusätzlicher Mechanismen, die eine Tumorbildung durch Adenovirus-transformierte Zellen fördern und durch virale Genprodukte der E4-Region beeinflusst werden, in Erwägung gezogen werden (zur Übersicht: Täuber und Dobner, 2001a).

2.2.3 Transformation humaner Zellen in Kultur

Trotz ihres onkogenen Potenzials in Nagetieren und ihrer Fähigkeit, primäre Nagetierzellen in Kultur vollständig zu transformieren, konnte bisher kein Zusammenhang zwischen Adenoviren und der Tumorentstehung beim Menschen hergestellt werden. Die Tatsache, dass viele Versuche humane Zellen in Kultur mit Adenovirus zu transformieren, fehlschlagen, weist darauf hin, dass eine abortive Infektion einer der Faktoren ist, der mit einer hocheffizienten Transformation von nicht-permissiven Nagerzellen assoziiert ist. Interessanterweise ist die Transformation humaner Zellen mit nicht-infektiösen, viralen, subgenomischen DNA-Fragmenten im Vergleich zu Nagetierzellen ebenfalls sehr ineffizient. Dies lässt darauf schließen, dass Permissivität nicht alleine den determinierenden Faktor für die Transformationseffizienz darstellt. Die molekularen Grundlagen, die dieser Beobachtung zugrunde liegen, sind jedoch noch weitgehend unbekannt, obwohl bereits einige Modelle diskutiert wurden (Hutton *et al.*, 2000; Shenk, 2001). Bis heute konnten nur wenige humane Zellen erfolgreich mit Ad12- oder Ad5-DNA-Fragmenten transformiert werden. Bei diesen Zellen handelt es sich im Allgemeinen

um embryonale Zellen, wie z. B. humane embryonale Nierenzellen (HEK, *human embryonal kidney cells*) (Graham *et al.*, 1977; Whittaker *et al.*, 1984; Shaw *et al.*, 2002), humane embryonale Lungenzellen (HEL, *human embryonal lung cells*) (van den Heuvel *et al.*, 1992), humane embryonale Retinoblasten (HER, *human embryonal retinoblasts*) (Gallimore *et al.*, 1986; Fallaux *et al.*, 1996; Fallaux *et al.*, 1998) und Amniozyten (Schiedner *et al.*, 2000). Reproduzierbar, wenn auch weniger effizient als Nagetierzellen, lassen sich jedoch nur humane, embryonale Retinoblasten und Amniozyten transformieren.

2.2.4 Persistenz und DNA-Integration

Die meisten Adenovirus-induzierten Tumoren, Tumorzelllinien und transformierten Zellklone zeichnen sich durch die Persistenz der viralen DNA über chromosomale Integration und die Expression virusspezifischer Antigene aus. Dementsprechend folgt die adenovirale Transformation meist dem klassischen Konzept der viralen Onkogenese, welche auf der Persistenz der viralen Gene in transformierten Zellen beruht (zur Übersicht: Graham, 1984). Allerdings wurde in Einzelfällen beobachtet, dass die ständige Anwesenheit und Expression adenoviraler Sequenzen nicht unbedingt für die Aufrechterhaltung des onkogenen Phänotyps verantwortlich sind (Paraskeva und Gallimore, 1980; Kuhlmann *et al.*, 1982; Paraskeva *et al.*, 1982; Pfeffer *et al.*, 1999). Während die Mehrzahl der durch Ad9 und Ad12 entstandenen Tumorzellen eine oder mehrere Kopien des viralen Genoms enthalten (Brusca *et al.*, 1984; Graham, 1984; Javier *et al.*, 1991), findet man in den meisten Nagetierzellen, die durch Ad2 oder Ad5 transformiert wurden, nur Teile des viralen Genoms (Graham, 1984). Dabei enthalten alle onkogen transformierten Zellen konsistent das linke Ende des viralen Genoms mit der E1-Region (zur Übersicht: Tooze, 1981; Graham, 1984). Ebenso können in den meisten vollständig transformierten Zelllinien, die nach Transfektion rekombinanter Plasmide etabliert wurden, kodierende Sequenzen für die E1A- und E1B-Onkogene in integrierter Form nachgewiesen werden. Aufgrund der Tatsache, dass einzig die E1-Region in virustransformierten Zellen konsistent

integriert und allein die Transfektion von Zellen in Kultur mit den E1-Genen zu einer onkogenen Transformation führt, ist anzunehmen, dass die E1-Genprodukte die Transformation initiieren und Funktionen vermitteln, die zur Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps benötigt werden. Einzige Ausnahme stellt Ad9 der Subgruppe D dar, dessen alleinige onkogene Determinante in der frühen Region 4 (E4) kodiert wird (Javier *et al.*, 1992).

Untersuchungen der letzten Jahre haben allerdings gezeigt, dass die Möglichkeit in Erwägung gezogen werden muss, dass zusätzliche Mechanismen bestehen, die die Adenovirus-vermittelte Transformation von Zellen fördern. Diese werden durch die Expression von viralen Genprodukten beeinflusst, die in der E4-Region kodiert sind. Dabei scheint allerdings die Anwesenheit der viralen Onkogene für die Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps nicht notwendig zu sein. Dies deutet auf einen *Hit&Run*-Mechanismus hin (zur Übersicht: Täuber und Dobner, 2001b; Täuber und Dobner, 2001a).

2.2.5 Struktur und Funktion adenoviraler Onkoproteine

2.2.5.1 E1-Region

Die Transformation durch Adenoviren ist ein vielstufiger Prozess, an dem mehrere Proteine der E1-Region beteiligt sind. Aufgrund der Tatsache, dass man in fast allen Ad- und Plasmid-transformierten Zellen E1A- und E1B-Proteine nachweisen kann, wurde das onkogene Potenzial von Adenoviren hauptsächlich der frühen Region 1 (E1) zugeordnet, die am linken Ende des adenoviralen Genoms lokalisiert ist (siehe Abb. 2). Diese Region kodiert für die Genprodukte der E1A- und E1B-Transkriptionseinheiten und ist für eine vollständige morphologische Transformation notwendig und ausreichend (zur Übersicht: Bernardis und Van der Eb, 1984; Graham, 1984; Shenk, 2001). Die E1A-Genprodukte allein führen zu einer Immortalisierung oder partiellen Transformation von Zellen (Houweling *et al.*, 1980).

Erst durch die zusätzliche Expression der E1B-Proteine werden die Zellen vollständig transformiert.

Die Hauptprodukte der E1A-Transkriptionseinheit sind zwei nukleäre, multifunktionelle Phosphoproteine (E1A-12S und E1A-13S), welche den proliferativen Status von Zellen beeinflussen können. Beide E1A-Proteine sind in der Lage, Zellen zu immortalisieren, die Zellzyklusbarrieren aufzuheben und, zusammen mit anderen viralen oder zellulären Onkogenen, Zellen zu transformieren. Diese Funktionen werden durch zahlreiche Interaktionen mit wachstumshemmenden und genregulatorischen Proteinen vermittelt (zur Übersicht: Russell, 2000).

Neben den transformierenden Eigenschaften induzieren die E1A-Genprodukte auch antiproliferative Mechanismen. Unter anderem wird durch die Induktion und Aktivierung des zellulären Tumorsuppressors p53 Apoptose eingeleitet (zur Übersicht: White, 1995; Chinnadurai, 1998; White, 1998). Jedoch ist E1A auch in der Lage p53-unabhängige Apoptosewege zu aktivieren (Teodoro *et al.*, 1995; Marcellus *et al.*, 1996).

Zur vollständigen morphologischen Transformation primärer Zellen sind zusätzlich zu den E1A-Genprodukten auch die E1B-Proteine notwendig. Die E1B-Transkriptionseinheit von Ad5 kodiert für zwei Onkoproteine, E1B-55K und E1B-19K. Beide Proteine transformieren in Kooperation mit E1A primäre Nagerzellen, wobei sie unabhängig voneinander, jedoch additiv wirken (Gallimore *et al.*, 1985; McLorie *et al.*, 1991). Wichtig dabei ist die Fähigkeit beider E1B-Proteine, auf unterschiedlichen Wegen den E1A-induzierten Zelltod zu blockieren (zur Übersicht: Chinnadurai, 1998; White, 1998). Das E1B-19K-Protein ist dem zellulären Proto-Onkogen Bcl-2 funktionell ähnlich und interagiert mit den Apoptoseregulatoren Bax und CED4. Obwohl E1B-19K nicht direkt mit p53 interagiert, kann es über einen noch unbekanntem Mechanismus die p53-induzierte Transrepression aufheben, die über den C-Terminus des Tumorsuppressorproteins vermittelt wird (zur Übersicht: White, 1996).

2.2.5.1.1 E1B-55K

Ad5 E1B-55K ist ein 496 Aminosäuren großes, multifunktionelles Phosphoprotein. Im Gegensatz zu E1B-19K ist es in der Lage über zwei zentrale Bereiche direkt an die N-terminale Domäne von p53 zu binden und dadurch die Transaktivierung p53-regulierter Gene zu inhibieren (Sarnow *et al.*, 1982; Kao *et al.*, 1990; Yew *et al.*, 1990; Shen *et al.*, 2001). Zahlreiche Untersuchungen machten deutlich, dass diese direkte Interaktion und die Repression der p53-vermittelten Transaktivierung essentiell für das transformierende Potenzial des viralen Proteins sind, da sie den E1A-induzierten antiproliferativen Eigenschaften entgegenwirken (Yew und Berk, 1992; Yew *et al.*, 1994). Gleichzeitig wird in transformierten Zellen der Tumorsuppressor E1B-55K-abhängig vom Zellkern in ein charakteristisches, zytoplasmatisches perinukleäres Proteinaggregat, den so genannten *perinuclear body* relokalisiert (Abb. 3; Zantema *et al.*, 1985a; Blair-Zajdel und Blair, 1988) und führt so zu einer räumlichen Umlokalisierung und eventuellen Inaktivierung von p53. Die Rolle und der molekulare Mechanismus der zytoplasmatischen Restriktion von p53 durch E1B-55K ist noch immer unklar. Dennoch konnte kürzlich gezeigt werden, dass Ad5 E1B-55K eine intrinsische nukleozytoplasmatische Pendelaktivität besitzt, die unabhängig von p53 und mdm2 ist (Krätzer *et al.*, 2000; Krätzer *et al.*, 2001).

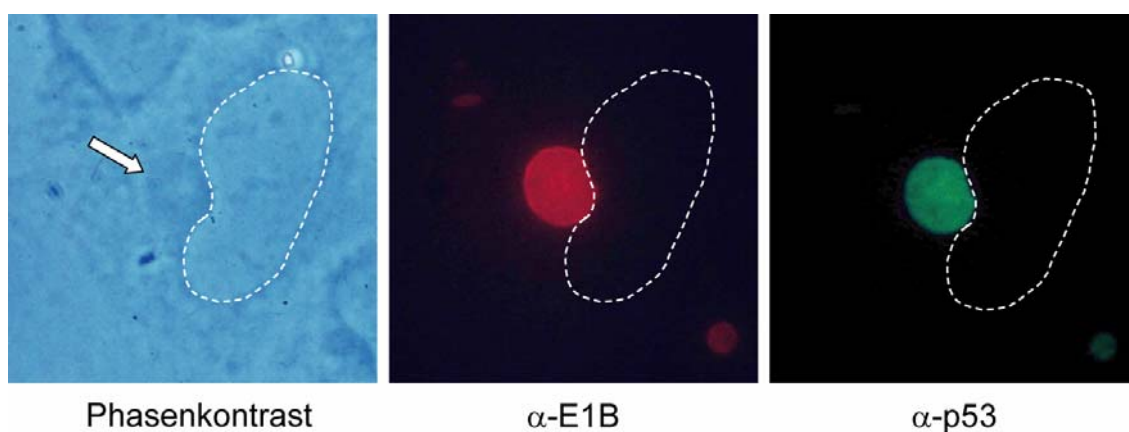


Abb. 3 Lage und Struktur des perinukleären Proteinkomplexes (*perinuclear body*)
 In E1A/E1B-55K-transformierten Zellen wird der Tumorsuppressor p53 E1B-55K-abhängig vom Zellkern in ein charakteristisches, zytoplasmatisches perinukleäres Proteinaggregat, den so genannten *perinuclear body* relokalisiert. Dargestellt ist die subzelluläre Lokalisation von E1B-55K (rot), p53 (grün) und eine Phasenkontrastaufnahme. Der Pfeil zeigt die Lage des perinukleären Komplexes.

Genetische und biochemische Daten zeigen, dass der nukleäre Export von E1B-55K durch den zellulären Exportrezeptor CRM1 vermittelt wird und ein Leucin-reiches nukleäres Exportsignal (NES) im N-terminalen Bereich des viralen Proteins benötigt (Krätzer *et al.*, 2000; Krätzer *et al.*, 2001; Endter *et al.*, 2001). Diese Beobachtungen könnten einen ersten Hinweis darauf geben, dass das CRM1-vermittelte nukleozytoplasmatische Pendeln von E1B-55K einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von p53 haben könnte. Auf diese Art und Weise könnte ein aktiver nukleärer Export des viralen Proteins auch ein wichtiger Mechanismus sein, wie E1B-55K die antiproliferativen Eigenschaften von p53 antagonisiert und somit zur vollständigen Transformation in Kooperation mit E1A beiträgt.

Die Bereiche in E1B-55K, die für die transformierenden Eigenschaften des Proteins notwendig sind, lokalisieren in verschiedenen Bereichen des Ad5 Proteins (Abb. 4). Sie umfassen das SUMO1-Konjugationsmotiv (ΨKXE) an Aminosäureposition 104 (Endter *et al.*, 2001), den p53-Bindungsbereich im zentralen Bereich (Yew *et al.*, 1990; Yew und Berk, 1992; Grand *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2001) sowie eine Region am C-terminalen Ende, die die Inhibition der p53-abhängigen und p53-unabhängigen Transaktivierung vermittelt (Teodoro *et al.*, 1994; Yew *et al.*, 1994; Teodoro und Branton, 1997). Zusätzlich zu der Repressionsdomäne befinden sich im C-Terminus des Proteins drei Aminosäurereste (S490/491, T495), an denen das virale Proteins phosphoryliert wird, was wiederum sowohl notwendig für die Repressionsaktivitäten als auch für die transformierenden Eigenschaften des Polypeptids ist (Teodoro *et al.*, 1994; Teodoro und Branton, 1997).

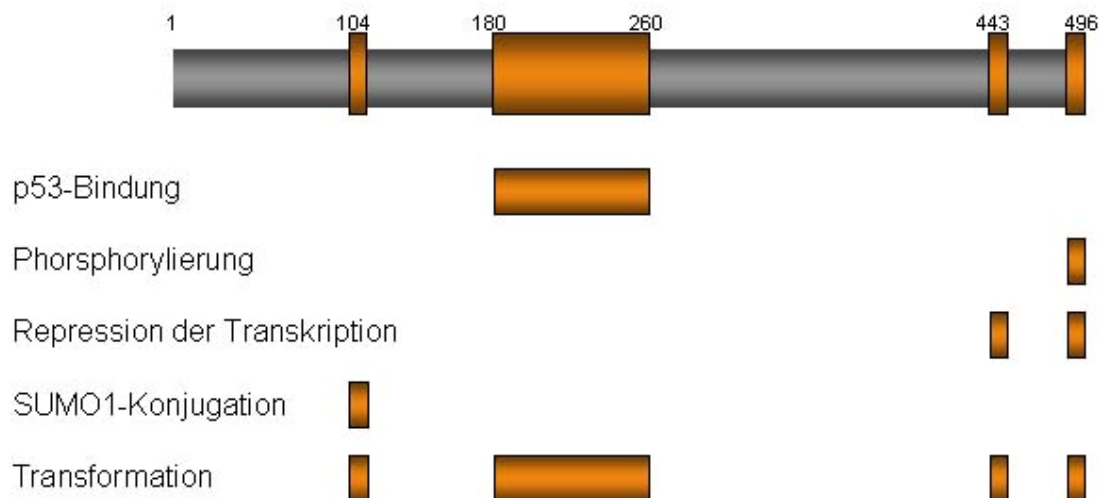


Abb. 4 Strukturelle und funktionelle Domänen von Ad5 E1B-55K im Kontext der Transformation

Dargestellt sind Bereiche von E1B-55K denen eine Funktion im Transformations-stimulierenden Prozess zugeordnet werden konnte. Nummern markieren dabei den Anfang oder das Ende der jeweiligen Domänen. Weitere Details zu den einzelnen Bereichen sind im Text angegeben.

In-vitro-Experimente haben gezeigt, dass für eine effiziente Inhibition der Transkription durch E1B-55K ein zellulärer Korepressor notwendig ist (Martin und Berk, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass durch die spezifische Interaktion von Ad2 E1B-55K mit HDAC1/mSin3A die Deacetylierung von Histonen katalysiert wird, was wiederum die Genexpression regulieren kann (Punga und Akusjärvi, 2000). Außerdem wurde beobachtet, dass Ad2 E1B-55K und Ad12 E1B-54K mit einer weiteren Acetyltransferase PCAF, wechselwirkt, die physikalische Interaktion mit p53 inhibiert und dadurch die Acetylierung von p53 verhindert, was zu einem fast vollständigen Verlust der sequenzspezifischen DNA-Bindungsaktivität von p53 führt (Liu *et al.*, 2000). Beide Wechselwirkungen könnten zur Inaktivierung von p53 und somit zur E1B-vermittelten Transformation beitragen.

Zusätzlich zur Inhibition und Modulation der transkriptionellen p53-Aktivitäten führt E1B-55K in Kooperation mit dem adenoviralen Protein E4orf6 zur Destabilisierung des Tumorsuppressors (Steegenga *et al.*, 1998; Querido *et al.*, 1997; Querido *et al.*, 2001b; Blanchette *et al.*, 2004). Die beiden viralen Proteine sind zusammen in der Lage zelluläre Proteine dem proteasomalen Abbau zuzuführen.

Dabei stellt E4orf6 die Verbindung zu einem SCF-ähnlichen E3-Ligasekomplex mit Elongin B und C, Cullin-5 und Rbx1 her und E1B-55K dient vermutlich als Substratlieferant (Querido *et al.*, 2001a; Harada *et al.*, 2002; Blanchette *et al.*, 2004). Aus diesem Grund sind alle zellulären und viralen Proteine, die Wechselwirkungen mit E1B-55K eingehen potenzielle Substrate dieses Komplexes. Bisher stehen p53 und eine Komponente des DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturkomplexes (MRN) Mre11 als tatsächliche Ziele des E1B-55K/E4orf6-Komplexes fest (Querido *et al.*, 2001a; Stracker *et al.*, 2002; Harada *et al.*, 2002; Blanchette *et al.*, 2004).

Der Hauptmechanismus über den E1B-55K zur virusinduzierten Transformation beiträgt, scheint die Modulation von p53 zu sein. Dennoch ist es nicht unwahrscheinlich, dass auch Wechselwirkungen mit anderen zellulären Proteinen zur vollständigen Transformation notwendig sind, da z. B. Untersuchungen an E1B-55K-deletierten Viren zeigten, dass das virale Protein unabhängig von p53 Zellzyklusrestriktionen aufheben kann (Goodrum und Ornelles, 1997; Goodrum und Ornelles, 1998; Dix *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 2001).

2.2.5.2 E4-Region

Nachdem man lange Zeit das transformierende Potenzial von Adenoviren einzig der E1-Region zusprach, kann nun auch der E4-Region eine wichtige Funktion im Transformationsprozess zugeordnet werden. Daten der letzten Jahre zeigen, dass die Proteine der E4-Region ein weites Spektrum an Funktionen umfassen, die für eine effiziente virale Replikation benötigt werden. Dabei agieren die E4-Proteine über ein komplexes Netzwerk aus Protein-Proteininteraktionen mit zellulären Faktoren, die in Transkription, Apoptose, Zellzykluskontrolle, DNA-Reparaturmechanismen, Signalübertragung, post-translationalen Modifikationen und der Erhaltung der Integrität von PML-NBs (PML *nuclear bodies*) involviert sind. Nach heutigem Kenntnisstand überlappen einige der lytischen Funktionen mit denen, welche für die onkogene Transformation primärer Säugerzellen verantwortlich sind (zur Übersicht: Täuber und Dobner, 2001a).

In den letzten Jahren fanden in Bezug auf Transformation und Onkogenität die beiden E4-Genprodukte E4orf3 und E4orf6 zunehmende Beachtung. Sie modulieren die Kontrollmechanismen der Wirtszelle im produktiven Infektionszyklus auf allen Ebenen der Genexpression. Dabei zeigen beide Proteine zum Teil funktionelle Überlappungen. Jedes der Genprodukte hat voneinander unabhängige Funktionen bezüglich der viralen DNA-Replikation, der späten viralen Proteinsynthese, dem Abschalten der Wirtszell-Proteinsynthese und der Produktion von Nachkommenviren. Ebenso inhibieren sie eine Konkatemerbildung des viralen Genoms (Halbert *et al.*, 1985; Bridge und Ketner, 1989; Huang und Hearing, 1989; Bridge und Ketner, 1990; Weiden und Ginsberg, 1994). Einige der redundanten Funktionen beruhen auf der Fähigkeit, mit den gleichen viralen und zellulären Faktoren zu interagieren. Sowohl E4orf3 als auch E4orf6 binden an E1B-55K (Sarnow *et al.*, 1984; Rubenwolf *et al.*, 1997; Leppard und Everett, 1999; Nevels *et al.*, 1999a) und an die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK), einem Schlüsselenzym in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (Boyer *et al.*, 1999). Es wird diskutiert, dass die Komplexbildung mit DNA-PK die Entstehung konkatemerer, viraler Genome verhindert (Weiden und Ginsberg, 1994; Boyer *et al.*, 1999; Nicolas *et al.*, 2000). Wichtig in diesem Zusammenhang ist auch die Interaktion von sowohl E4orf3 als auch E1B-55K/E4orf6 mit Mre11, einer Komponente des DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturkomplexes, die für die virale Replikation und die Vermeidung der Konkatemerbildung der Virusgenome notwendig ist (Stracker *et al.*, 2002; Mohammadi *et al.*, 2004; Evans und Hearing, 2005; Stracker *et al.*, 2005; Araujo *et al.*, 2005).

Es konnte mittlerweile sowohl für Ad5 E4orf6 als auch für Ad5 E4orf3 ein transformierendes und onkogenes Potenzial gezeigt werden. In Kooperation mit den Proteinen der E1-Region sind beide E4-Genprodukte in der Lage die *Focus*-Bildung von primären Rattennierenzellen zu verstärken (Moore *et al.*, 1996; Rubenwolf *et al.*, 1997; Nevels *et al.*, 1999a; Nevels *et al.*, 1999b). Zellen, die stabil E1A, E1B, E4orf3 und/oder E4orf6 exprimieren, besitzen viele zusätzliche Eigenschaften, die mit einer

vollständigen onkogenen Transformation im Zusammenhang stehen. Diese schließen vor allem grundlegende morphologische Veränderungen und, insbesondere bezüglich E4orf6, auch ein dramatisch erhöhtes Tumorwachstum in Nacktmäusen mit ein (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1999a; Nevels *et al.*, 1999b).

Dabei liegen den onkogenen Aktivitäten von E4orf6 unterschiedliche Wirkmechanismen zugrunde. Die hochgradig transformierten, E4orf6-assoziierten Phänotypen stimmen mit einer dramatischen Reduktion der p53-Menge überein. Diese korrelieren wiederum invers mit der E4orf6-Expression (Nevels *et al.*, 1999a). Anscheinend wirken E4orf6 und E1B-55K kooperativ der E1A-induzierten Stabilisierung von p53 entgegen, indem p53 verstärkt dem proteasomalen Abbau zugeführt wird (Grand *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 1996; Rubenwolf *et al.*, 1997; Querido *et al.*, 1997; Steegenga *et al.*, 1998; Roth *et al.*, 1998; Nevels *et al.*, 1999a; Wienzek *et al.*, 2000; Cathomen und Weitzman, 2000; Boyer und Ketner, 2000). Obwohl p53 sowohl an die N- als auch C-terminale Domäne des E4orf6-Proteins bindet (Querido *et al.*, 2001a), ist für eine Transformation nur der C-Terminus von E4orf6 notwendig. Diese Effekte sind unabhängig von der p53-Stabilität, umfassen jedoch andere Interaktionen mit dem Tumorsuppressor (Dobner *et al.*, 1996; Rubenwolf *et al.*, 1997; Querido *et al.*, 1997).

Die Fähigkeit von E4orf3 Zellen onkogen zu transformieren ist im Gegensatz zu E4orf6 nicht mit der Funktion und Stabilität von p53 assoziiert. Vermutlich beruhen diese Effekte auf der Interaktion mit dem E1B-55K-Protein (König *et al.*, 1999; Leppard und Everett, 1999) und der Kolokalisation mit den PML-NBs (Nevels *et al.*, 1999b). Es konnte jedoch bisher keine Interaktion mit dem PML-Genprodukt, dem Markerprotein der PML-NBs, nachgewiesen werden (Nevels *et al.*, 1999b).

2.3 PML-NBs

2.3.1 Generelle Eigenschaften der PML-NBs

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass der Zellkern stark strukturiert ist. Neben den gut charakterisierten Nukleolus, Hetero- und Euchromatin gibt es auch diverse nukleäre Proteinkomplexe, auch *nuclear bodies* (NBs) genannt, die je nach ihrer Zusammensetzung verschiedenste Funktionen erfüllen, wie z. B. *Cajal bodies*, *cleavage bodies* oder *splicing speckles*. In den letzten Jahren rückten immer mehr die sogenannten PML-NBs in den Mittelpunkt des Interesses, da sie mit verschiedenen humanen Erkrankungen, wie promyelozytische Leukämie oder AIDS in Verbindung gebracht werden können. PML-NBs, die auch unter den Namen PODs (PML *oncogenic domains*), ND10s (*nuclear domains 10*) oder *Kr bodies* (*Kremer bodies*) bekannt sind, sind makromolekulare, matrixassoziierte Multiproteinkomplexe, die aber nicht auf Nukleinsäuren angewiesen sind, da DNase- oder RNase-Behandlung nicht deren Morphologie ändert (Ascoli und Maul, 1991; Stuurman *et al.*, 1992). Sie konnten bisher in allen untersuchten Säugerzellen während des gesamten Zellzykluses detektiert werden, wobei ihre Anzahl während der G1-Phase am größten ist (Chan *et al.*, 1997). Typischerweise findet man 10 - 30 PML-NBs pro Zellkern, die in ihrer Größe zwischen 0,2 und 1 μm variieren (Melnick und Licht, 1999). Ihre Zusammensetzung ist sehr heterogen und hängt vom Zelltyp, dem Stadium des Zellzykluses und dem Hormonstatus der Zelle ab, wobei einige zelluläre Faktoren in einer Vielzahl von NBs vorhanden sind (Doucas und Evans, 1996; Carlile *et al.*, 1998; LaMorte *et al.*, 1998; Ferbeyre *et al.*, 2000).

2.3.2 Komponenten und Funktionen der PML-NBs

Das erste mit diesen Strukturen assoziierte Protein, das beschrieben wurde, Sp100, wurde ursprünglich bei der Untersuchung von Autoimmunantikörpern bei Patienten mit primärer Gallenblasenzirrhose molekular charakterisiert (Szostecki *et al.*, 1990; Xie *et al.*, 1993). Die Hauptkomponente der PML-NBs ist das PML-Protein, das

ursprünglich im Zuge der akuten promyelozytischen Leukämie (APL) als Fusionspartner von RAR α nach einer Chromosomentranslokation t(15:17) entdeckt wurde (Kakizuka *et al.*, 1991; Goddard *et al.*, 1991; Kastner *et al.*, 1992; Melnick und Licht, 1999; de The *et al.*, 1991; Pandolfi *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1992). Die verschiedenen PML-Isoformen werden in allen Säugetierzellen exprimiert und der Hauptteil lokalisiert in den PML-NBs, obwohl auch ein kleiner Anteil in zytoplasmatischen Komplexen oder löslich im Zellkern lokalisiert ist (Terris *et al.*, 1995; Fagioli *et al.*, 1992; Flenghi *et al.*, 1995). In APL-Patienten wurde erstmals die wichtige Rolle der PML-NBs während der Zelldifferenzierung und des Zellwachstums deutlich, da dort die PML-NB-Strukturen aufgelöst sind. Die Identifizierung anderer mit den PML-NBs assoziierter Proteine, lässt nun Rückschlüsse auf die möglichen Funktionen dieser subnukleären Kompartimente zu (Tab. 2; zur Übersicht: Negorev und Maul, 2001; Eskiw und Bazett-Jones, 2002; Dellaire und Bazett-Jones, 2004; Ching *et al.*, 2005).

Tab. 2 Ausgewählte Beispiele von PML-NB-assoziierten zellulären Proteinen und ihre bisher bekannten Funktionen

PROTEIN	FUNKTION	REFERENZ
BLM	DNA-Helikase; komplexiert mit RP-A und Rad51 in den PML-NBs	Sanz <i>et al.</i> , 2000; Bischof <i>et al.</i> , 2001
CBP	Proteinacetyltransferase, Koaktivator	LaMorte <i>et al.</i> , 1998; Boisvert <i>et al.</i> , 2001
daxx	Rolle in der Fas-vermittelten Apoptose, bei der Repression der Transkription und der Chromatinumgestaltung	Ishov <i>et al.</i> , 1999; Everett <i>et al.</i> , 1999
eIF4E	bindet die 5`m ⁷ G-CAP der mRNA; assoziiert mit Ribosomen; Initiation der Translation	Lai und Borden, 2000
Hipk2	Serin/Threonin-Kinase; assoziiert mit p53 und CBP	Hofmann <i>et al.</i> , 2002
mdm2	reguliert den p53-Proteinlevel	Kurki <i>et al.</i> , 2003

PROTEIN	FUNKTION	REFERENZ
Mre11/NBS1	Rolle bei der DNA-Reparatur; komplexieren mit Rad50 in den PML-NBs und mit speziellen PML-NBs in Zellen mit ALT (<i>alternative telomere lengthning</i>)	Lombard und Guarente, 2000; Wu <i>et al.</i> , 2000
p53	Tumorsuppressor, Transkriptionsfaktor	Fogal <i>et al.</i> , 2000; Pearson <i>et al.</i> , 2000
PML	Tumorsuppressor, verschiedene nukleäre Funktionen	Melnick und Licht, 1999
pRb	Transkriptionsregulator	Alcalay <i>et al.</i> , 1998
Sp100	Transkriptionsrepressor	Szostecki <i>et al.</i> , 1990
SUMO1	(<i>small ubiquitin-like modifier</i>) post-translationale Modifikation	Boddy <i>et al.</i> , 1996
TRF1/TRF2	Telomer-bindende Proteine; kolokalisieren mit den PML-NBs in Zellen mit ALT (<i>alternative telomere lengthning</i>)	Yeager <i>et al.</i> , 1999

Obwohl bisher über 60 Proteine bekannt sind, die zusammen mit PML in den PML-NBs lokalisieren, ist ihre genaue Rolle noch ungeklärt. Aufgrund der verschiedensten Aktivitäten der PML-NB-Komponenten könnte ihnen aber eine Rolle in nahezu jeder nukleären Funktion zugeschrieben werden (Abb. 5), wie z. B. Transkriptionsregulation (zur Übersicht: Zhong *et al.*, 2000), DNA-Reparatur (zur Übersicht: Dellaire und Bazett-Jones, 2004), Apoptose (zur Übersicht: Takahashi *et al.*, 2004), Tumorsuppression (zur Übersicht: Salomoni und Pandolfi, 2002), Proteolyse (Lallemant-Breitenbach *et al.*, 2001) und der antiviralen Zellantwort (zur Übersicht: Regad und Chelbi-Alix, 2001).

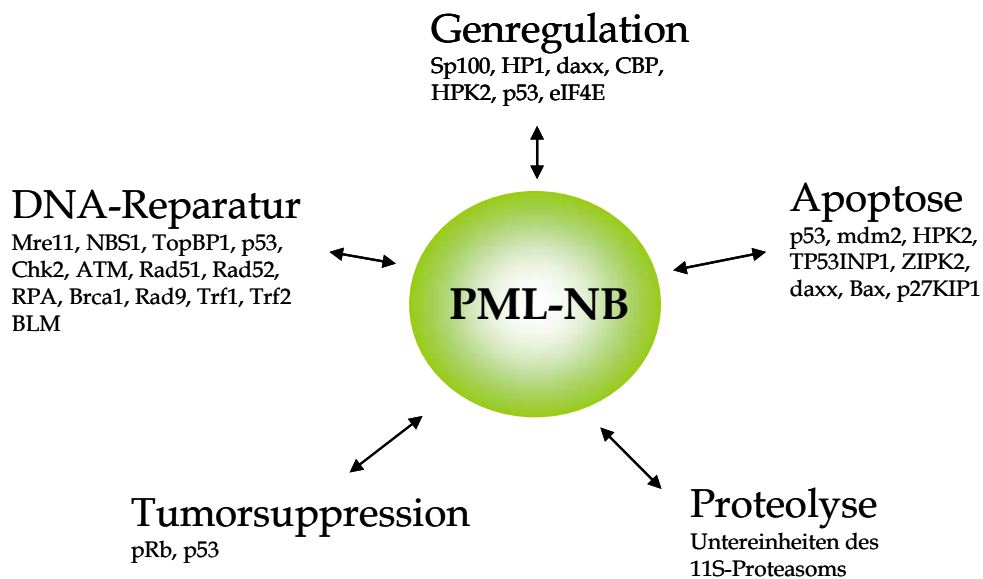


Abb. 5 Verschiedene Komponenten der PML-NBs und deren nukleäre Funktionen

Dargestellt sind verschiedene mit den PML-NBs-assoziierte Proteine. Aufgrund ihrer unterschiedlichen zellulären Aktivitäten könnte ihnen so eine wichtige Funktion in vielfältigen nukleären Prozessen wie Genregulation, Apoptose, Proteolyse, Tumorsuppression oder DNA-Reparatur zugeordnet werden (nach *nuclear protein database* <http://npd.hgu.mrc.ac.uk>)

Trotz aller Untersuchungen, die bisher zu den PML-NB-Strukturen durchgeführt wurden, ist ihre Funktion noch immer nicht aufgeklärt. Bisher werden drei Modelle diskutiert. Im ersten Modell stellen die PML-NBs eine Art Proteinlagerstätte dar, über die der nukleoplasmatische Level der Proteine durch gezielte Aggregation reguliert wird und die entsprechenden Komponenten jeweils dann aus den PML-NBs entlassen werden, wenn sie löslich gebraucht werden (zur Übersicht: Negorev und Maul, 2001). Das zweite Modell postuliert, dass PML-NBs ein Ort sind, an dem post-translationale Modifikationen oder der Abbau von Proteinen stattfinden. Dafür spricht, dass dort die Acetylierung und Phosphorylierung von p53 stattfindet, welche dessen Aktivität modulieren (Pearson *et al.*, 2000; D'Orazi *et al.*, 2002; Hofmann *et al.*, 2002). Außerdem wird für verschiedene Proteasomenkomponenten eine Lokalisation in den PML-NBs beschrieben (Lafarga *et al.*, 2002). Im dritten Modell stellen die PML-NBs Orte mit spezifischen nukleären Aktivitäten, wie Transkriptionsregulation, DNA-Replikation oder DNA-Reparatur dar, da sie mit Orten hoher transkriptioneller Aktivität assoziiert sind (Wang *et al.*, 2004), in deren

Peripherie naszierende RNA detektiert werden konnte oder verschiedene Reparaturproteine sequestriert werden (zur Übersicht: Borden, 2002; Boisvert *et al.*, 2000).

Letztendlich ist momentan die Frage noch offen, ob es sich bei den PML-NBs um inaktive Proteinlagerstätten oder um Orte mit sehr spezifischen Aktivitäten von PML oder PML-assoziierten Proteinen handelt, die sonst nirgends im Nukleoplasma stattfinden. Allerdings scheint die Sequestration von verschiedenen zellulären Proteinen eine wichtige Rolle bei diversen Vorgängen wie Apoptose, Zellzyklusprogression, Telomererhaltung oder Differenzierung zu spielen (Ruggero *et al.*, 2000; Grobelny *et al.*, 2000).

2.3.3 Wechselwirkungen verschiedener Viren mit den PML-NBs

Verschiedene DNA- und RNA-Viren interagieren mit den PML-NBs und die Untersuchungen dieser Wechselwirkungen haben sehr zum Verständnis der PML-NB-Funktionen beigetragen. Auffällig dabei war zunächst, dass das antivirale Cytokininterferon (IFN) die Anzahl und Größe der PML-NBs verdoppelt und die verstärkte Expression von assoziierten Faktoren wie Sp100 und PML induziert (Guldner *et al.*, 1992; Lavau *et al.*, 1995; Maul *et al.*, 1995; Stadler *et al.*, 1995; Grotzinger *et al.*, 1996), was vermutlich auf eine wichtige Rolle in der antiviralen Zellantwort hinweisen könnte. Außerdem liegen die Transkriptions- und Replikationszentren vieler Viren in unmittelbarer topologischer Nähe zu den PML-NBs (zur Übersicht: Maul, 1998). Frühe Experimente mit dem humanen Herpes Simplex Virus Typ-1 (HSV-1) zeigten, dass die Replikationszentren eine nicht zufällige Verteilung haben. Zunächst wurde spekuliert, ob diese Orte *de novo* aufgebaut werden oder bereits vorher existierende nukleäre Kompartimente nutzen (de Bruyn Kops und Knipe, 1994). Dabei sind die PML-NBs verantwortlich für die gezielte Verteilung der HSV-1-Replikationszentren (Maul *et al.*, 1996). Auch für Ad5, Simian-Virus Typ-40 (SV40) und das humane Cytomegalievirus (HCMV) konnte eine enge Verknüpfung der Replikationszentren mit den PML-NBs gezeigt werden und

sie nehmen damit eine zentrale Rolle im viralen Replikationszyklus ein (Ishov und Maul, 1996; Ishov *et al.*, 1997; Maul, 1998).

Neben der Verbindung der Replikation vieler Viren mit den PML-NBs stellen auch die Strukturen an sich einen direkten Angriffspunkt vieler Viren dar. Ebenso wie bei Patienten mit APL, bei denen die strukturelle Integrität der PML-NBs durch die RAR α -PML-Fusion zerstört wurde, finden sich auch viele virale Faktoren von Adeno-, Herpes-, Hepatitis- und Papillomviren, die zur Modifizierung und Auflösung dieser Strukturen beitragen (Everett und Maul, 1994; Carvalho *et al.*, 1995; Kelly *et al.*, 1995; Puvion-Dutilleul *et al.*, 1995; Day *et al.*, 1998; Borden *et al.*, 1998; Bell *et al.*, 2000). Auch für das humane Immundefizienzvirus Typ-1 (HIV-1) und das humane T-Zell-Leukämievirus Typ-1 (HTLV-1) wurden PML-NB-modifizierende Proteine beschrieben (Desbois *et al.*, 1996; Doucas und Evans, 1999; Turelli *et al.*, 2001). Dabei gibt es verschiedene Mechanismen der Inaktivierung dieser Strukturen. HSV-1 und HCMV lösen beispielsweise sehr schnell nach Infektion die PML-NBs durch die Expression von ICP0 bzw. IE72 auf (Maul *et al.*, 1993; Kelly *et al.*, 1995; Koriath *et al.*, 1996; Ishov *et al.*, 1997). Die lytische Replikation des Epstein Barr Virus (EBV) hingegen führt zu einer sequenziellen Zerstörung, wobei zunächst sehr schnell Sp100 und daxx, später dann langsamer PML umverteilt werden (Bell *et al.*, 2000). Außerdem lokalisiert EBNA-5, das an der Immortalisierung von humanen B-Zellen beteiligt ist (Mannick *et al.*, 1991; Sinclair *et al.*, 1994) in transformierten und infizierten Zellen in den PML-NB-Strukturen (Szekely *et al.*, 1996). Infektionen mit Ad5 hingegen führen zu einer Umlokalisierung der PML-NB-Proteine in elongierte, fibrilläre Strukturen, wobei die Expression von E4orf3 ausreichend ist und zur Sequestration von E1B-55K in diese elongierten PML-Strukturen führt (Carvalho *et al.*, 1995; Puvion-Dutilleul *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996).

Der genaue Zusammenhang zwischen PML-NBs und dem viralen Lebenszyklus ist noch unklar. Die Tatsache, dass zahlreiche Tumorsuppressorproteine wie p53 und PML oder das Autoimmunantigen Sp100 und verschiedene virale Onkoproteine in den PML-NBs lokalisieren und der Aspekt, dass die PML-NBs selbst eine Beteiligung

bei der malignen Erkrankung APL haben, weist darauf hin, dass es sich dabei auch um wichtige Strukturen handelt, die eine zentrale Rolle bei der virus-vermittelten Transformation spielen.

2.4 Aufgabenstellung

Die Inaktivierung des zellulären Tumorsuppressorproteins p53 auf der Ebene der Transkription stellt einen zentralen Mechanismus dar, über den das Ad5 E1B-55K-Protein zur Zelltransformation und Tumorgenese beiträgt. Darüber hinaus gibt es zahlreiche neue Beobachtungen, die auf weitere, möglicherweise p53-unabhängige Funktionen hinweisen. An erster Stellen stehen dabei die Umverteilung von kernständigen, zellulären Faktoren in zytoplasmatische Aggregate durch eine intrinsische Kernexportaktivität, posttranslationale Funktionen, Komponenten von Zellkerndomänen (PML-NBs) und zwei hoch konservierte Proteininteraktionsmotive (BC-Box und RING-Finger), die wahrscheinlich die Wechselwirkung mit Schlüsselregulatoren der zellulären Wachstumskontrolle steuern und eine wichtige Rolle im E1B-55K-vermittelten Transformationsprozess spielen.

Auf der Grundlage dieser Beobachtungen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe verschiedener E1B-Mutanten die Bedeutung der Kernexportfunktion und beider Proteininteraktionsdomänen im E1B-vermittelten Transformationsvorgang aufgeklärt werden. Dazu sollte zunächst der Einfluss der Mutationen auf die onkogenen und transkriptionshemmenden Eigenschaften von E1B-55K mittels klassischer Transformationsversuche und funktioneller Reporteranalysen überprüft werden. Aus den Transformationsansätzen sollten anschließend Zelllinien etabliert und auf Veränderungen der subzellulären Lokalisation der E1B-Proteine und zellulärer Interaktionspartner untersucht werden. Schließlich sollten zur Aufklärung zugrunde liegender molekularer Mechanismen die Zelllinien zusätzlich verschiedenen biochemischen und funktionellen Proteinanalysen unterzogen werden.

Insgesamt sollten diese Arbeiten zu neuen grundlegenden Erkenntnissen führen, über die E1B-55K den mehrstufigen Prozess der Zelltransformation steuert. Diese könnten für verschiedene pathogene Prozesse bei Virus-Wirts-Wechselwirkungen Allgemeingültigkeit besitzen und als Ausgangspunkt für die Konzeption neuer antiviraler Strategien dienen.

3 Material

3.1 Zellen

3.1.1 Bakterienstämme

Zur Klonierung rekombinanter DNA und Amplifikation von Plasmiden wurden die *E. coli*-Stämme DH5 α und DH10B (Stratagene) verwendet. Zur Expression und Reinigung von Fremdproteinen wurde der *E. coli*-Stamm TOPPTM5 verwendet. Bei der QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis kamen XL1-Blue (Stratagene) zum Einsatz.

BEZEICHNUNG	GENOTYP
DH5 α	<i>supE44, ΔlacU169, (ϕ80dlacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i> (Hanahan, 1983)
DH10B	<i>F'araD139, Δ(ara, leu)7697, ΔlacX174, galU, galK, mcrA, Δ(mrr, hsdR-, mcrBC), rspL, deoR, (ϕ80dlacZΔM15), endA1, nup5, recA1</i> (Bethesda Research Laboratories)
TOPP TM 5	<i>rif^r [F'proAB lacI^qZΔM15, Tn10 (Tet^r)]</i> (Hatt <i>et al.</i> , 1992)
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F'proAB, lacI^qZΔM15, Tn10 (Tet^r)]</i> (Bullock, 1987)

3.1.2 Säugerzellen

BEZEICHNUNG	MERKMAL
BRK	Primäre Nierenzellen aus 3-5 Tage alten Sprague-Dawley-Ratten
BRK1	Spontan immortalisierte BRK-Zellen
H1299	Humane, p53-negative Zelllinie aus einem Lungenkarzinom (Mitsudomi <i>et al.</i> , 1992)
AB18/ AB115	Etablierte Rattenzelllinien transformiert mit E1A (12S und 13S) sowie E1B-55K L83A/L87A/L91A
AB19	Etablierte Rattenzelllinien transformiert mit E1A (12S und 13S) sowie E1B-55K K104R

AB120	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S) sowie Wildtyp-E1B-55K
AB53	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S) sowie E1B-55K L180P/C184F
AB57	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S) sowie E1B-55K C184T
AB72	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S) sowie E1B-55K C454S/C456S
ABS1	Etablierte Rattenzelllinie transformiert mit E1A (12S und 13S), E1B-55K und E4orf6
mAB12.1	Zelllinie etabliert aus dem AB120-Tumorgewebe von Nacktmäusen
mABNES3.1	Zelllinie etabliert aus dem AB115-Tumorgewebe von Nacktmäusen

3.2 Nukleinsäuren

3.2.1 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden als Startermoleküle für Sequenzreaktionen, PCR-Amplifikationen und die Einführung von Mutationen durch PCR verwendet. Sie wurden von der Firma Metabion bezogen. In der ersten Spalte ist die Nummer des Oligonukleotids in der *Filemaker Pro*-Datenbank der Arbeitsgruppe angegeben.

#	Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
110	E1B 361-389 rev	CGG TGT CTG GTC ATT AAG CTA AAA	Sequenzierung
112	E1B 1197-1215 fw	CGG TAA CAG GAG GGG GGT G	Sequenzierung
635	pcDNA3-forw	ATG TCG TAA CAA CTC CGC	Sequenzierung
636	pcDNA3-rev	GGC ACC TTC CAG GGT CAA G	Sequenzierung
687	fwd-E1B55-1042-BamHI	GCC AGG ATC CTG TGG CAA CTG CGA GG	Amplifikation
688	Rev-E1B55-1491-EcoRI	GCC AGA ATT CTC AAT CTG TAT CTT C	Amplifikation
782	Seq E1-Box fwd	CAA GGA TAA TTG CGC TAA TGA GC	Sequenzierung

783	Seq E1B-Box rev	CCA CAC TCG CAG GGT CTG C	Sequenzierung
914	C184T	GCA AAG GTG GCA CTT AGG CCA GAT ACC AAG TAC AAG ATC AGC	Mutagenisierung
915	C184T	GCT GAT CTT GTA CTT GGT ATC TGG CCT AAG TGC CAC CTT TGC	Mutagenisierung
924	C454S/C256S	CCA GGT GCA GAC CCT CCG AGT CTG GCG GTA AAC ATA TTA GG	Mutagenisierung
925	C454S/C256S	CCT AAT ATG TTT ACC GCC AGA CTC GGA GGG TCT GCA CCT GG	Mutagenisierung
910	L180P/C184F	GCA AAG GTG GCA CCT AGG CCA GAT TTC AAG TAC AAG ATC AGC	Mutagenisierung
911	L180P/C184F	GCT GAT CTT GTA CTT GAA ATC TGG CCT AGG TGC CAC CTT TGC	Mutagenisierung

3.2.2 Vektoren

Folgende Vektoren wurden für Subklonierungen oder zur Transfektion als Vektorkontrolle verwendet. In der ersten Spalte angegeben ist die Nummer des Vektors in der *Filemaker Pro*-Datenbank der Arbeitsgruppe.

#	BEZEICHNUNG	VERWENDUNG	REFERENZ
129	pG4	Luziferase-Assay; Expressionsvektor für Gal4-Fusionen	Sadowski und Ptashne, 1989
7	pGEX-2T	Bakterieller Expressionsvektor mit GST-Anteil	Pharmacia
77	pGL2-basic	<i>Firefly</i> -Luziferase-Assay	Promega
136	pcDNA3	Expressionsvektor für Säugerzellen, CMV-Promotor	Invitrogen
181	pRL-TK	<i>Renilla</i> -Luziferase-Assay	Promega

3.2.3 Rekombinante Plasmide

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

#	BEZEICHNUNG	KURZ-NAME	VEKTOR	FREMDGEN-EXPRESSION	REFERENZ
2	pC53SN3		pCMV/neo	humanes p53 cDNA	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
107	pGal4-E1B-55KDa	pGal4-E1B-55K	pG4	Ad5 E1B-55K	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
375	pGL-GalTK-Luc	pGalTK-Luc	pGL2-basic	Gal4-DNA-Bindungssequenz	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
499	pRE-LUC		unbekannt	CMV-Promotor, fünf p53-Bindungsstellen	N. Horikoshi
608	pXC15		pML	Ad5 E1-Region	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
715	pcDNA3-E4orf6flu	pE4orf6	pcDNA3	Ad5 E4orf6	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
737	pE1A		pML	Ad5 E1A-12S und -13S	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1010	pcDNA3-E1B-55KDa	pE1B-55K	pcDNA3	Ad5 E1B-55K	Moore <i>et al.</i> , 1996
1022	pcDNA3-E1B K104R	pE1B-K104R	pcDNA3	Ad5 E1B-55K	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1023	pcDNA3-E1B L83A/L87A/L91A	pE1B-NES	pcDNA3	Ad5 E1B-55K	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1138	pGST-E1B-348-496	GST-E1B ^c	pGEX-2T	Ad5 E1B-55K	diese Arbeit
1282	pcDNA3-E1B C454S/C456S	pE1B-RF6	pcDNA3	Ad5 E1B-55K	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1283	pcDNA3-E1B L180P/C184F	pE1B-BC1	pcDNA3	Ad5 E1B-55K	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1285	pcDNA3-E1B C184T	pE1B-BC3	pcDNA3	Ad5 E1B-55K	Stammsammlung der Arbeitsgruppe

1467	p β cyclinG-LUC	p-tk-Luc	p53-abhängiger cyclinG-Promotor	Punga und Akusjarvi, 2003
1524	pGal4-E1B-RF6	pG4	Ad5 E1B-55K	diese Arbeit
1525	pGal4-E1B-BC1	pG4	Ad5 E1B-55K	diese Arbeit
1526	pGal4-E1B-BC3	pG4	Ad5 E1B-55K	diese Arbeit

3.3 Antikörper

3.3.1 Primärantikörper

BEZEICHNUNG	SPEZIFIKATION
1807	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen E4orf6 von Ad5 (Boivin <i>et al.</i> , 1999)
2A6	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das E1B-55K-Protein von Ad5 (Sarnow <i>et al.</i> , 1982)
5E10	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das PML-Protein (Stuurman <i>et al.</i> , 1992)
7C11	Monoklonaler Ratten-Antikörper gegen die 50 C-terminalen AS von Ad5 E1B-55K-Protein (diese Arbeit)
β -actin (AC-15)	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen β -actin (Sigma)
daxx (M-112)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen daxx (Santa Cruz)
FL393	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen p53 des Menschen (Santa Cruz)
M73	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen E1A-12S und -13S von Ad5 (Harlow <i>et al.</i> , 1985)
Mre11	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das humane Mre-11-Protein (Abcam)
Rad50	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Rad50 (Abcam)
Vimentin	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen Vimentin (Sigma)

3.3.2 Sekundärantikörper

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

HRP-Anti-Maus IgG	Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper gegen Maus IgGs aus Schaf (Amersham Life Science)
HRP-Anti-Ratte IgG	Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper gegen Ratte IgGs aus Ziege (Amersham Life Science)
HRP-Anti-Kaninchen IgG	Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper gegen Ratte IgGs aus Esel (Amersham Life Science)

Folgende Sekundärantikörper wurden für Immunfluoreszenzanalysen verwendet:

FITC-Anti-Ratte IgG	Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-gekoppelter Antikörper gegen Ratte IgGs aus Esel; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (H + L; Dianova)
FITC-Anti-Maus IgG	Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-gekoppelter Antikörper gegen Maus IgGs aus Esel; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (H + L; Dianova)
FITC-Anti-Kaninchen IgG	Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen IgGs aus Esel; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (H + L; Dianova)
<i>Texas Red</i> -Anti-Ratte IgG	<i>Texas Red</i> -gekoppelter Antikörper gegen Ratte IgGs aus Esel; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (H + L; Dianova)
<i>Texas Red</i> -Anti-Maus IgG	<i>Texas Red</i> -gekoppelter Antikörper gegen Maus IgGs aus Esel; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (H + L; Dianova)
<i>Texas Red</i> -Anti-Kaninchen IgG	<i>Texas Red</i> -gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen IgGs aus Esel; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (H + L; Dianova)

3.4 Größen- und Molekulargewichtsstandards

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Molekülen in Agarosegelen wurde die *1 kb DNA ladder* (Gibco BRL) verwendet.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen bei der SDS-Gelelektrophorese wurde der *Precision Protein Standard* (BioRad) verwendet.

3.5 Kommerzielle Systeme

Folgende kommerzielle Systeme wurden verwendet:

PRODUKT	FIRMA
<i>Dual-Luciferase® Reporter Assay System</i>	Promega
Qiagen Plasmid Midi, Maxi und <i>Gel Extraction Kit</i>	Qiagen
<i>DNeasy Tissue Kit</i>	Qiagen
<i>Protein-Assay</i>	BioRad
<i>QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	Stratagene
<i>SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate</i>	Pierce

3.6 Tiere

TIERE	FIRMA
NMRI (<i>nu/nu</i>) Nacktmäuse	Tierzucht des Tierstalls der Universität Regensburg, Dr. Thilo Spruss
Sprague-Dawley-Ratten	Charles River (Kißlegg)

3.7 Enzyme und Reagenzien

Folgende Enzyme und Reagenzien wurden verwendet:

PRODUKT	FIRMA
DAPI (4',6-Diamidin-2'-Phenylindol Dihydrochlorid)	Sigma
<i>Complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail</i> Tabletten	Roche
Kollagenase/Dispase	Roche
Leptomycin B	Biomol
Protein-A-Sepharose CL-4B	Sigma

Restriktionsenzyme	Roche und New England Biolabs
Taq-DNA-Polymerase/Pwo-DNA-Polymerase	Roche
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs

3.8 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Wenn im Text nicht anders aufgeführt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Sigma und Merck, Zellkulturmaterial von den Firmen Falcon, Gibco BRL und Pan, sonstiges Plastikmaterial von den Firmen Falcon, Sarstedt, Greiner und Eppendorf bezogen.

3.9 Computerprogramme und Datenbanken

Texte und Tabellen dieser Arbeit wurden mit Microsoft Office XP Professional (Microsoft) auf einem PC erstellt. Zeichnungen, Diagramme und Abbildungen wurden mit den Programmen Adobe Illustrator CS (Adobe) sowie Adobe Photoshop CS (Adobe) angefertigt oder nachbearbeitet. Homologie- und Motivsuchen auf Protein- und DNA-Ebene wurden mit den Programmen FASTA und BLAST aus dem Software-Paket UWGCG (Genetics Computer Group) (Devereux *et al.*, 1984) sowie mit Hilfe des BLAST-servers (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Biotechnology Information Center) durchgeführt. Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm BioEdit 4.8.5 erzeugt (Hall, 1999). Digitale Immunfluoreszenzbilder wurden mit Hilfe der Software Meta View 4.6 (Universal Imaging Corporation) erstellt. Für die Literatursuche wurde die MEDLINE-Datenbank (National Library of Medicine) unter der Adresse (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>) herangezogen.

4 Methoden

4.1 Bakterien

4.1.1 Kulturbedingungen und Lagerung

Plattenkulturen

Mit einer sterilen Impföse wurden ausgehend von einer Bakterienkolonie, einer Flüssigkultur oder einer Glyzerinkultur Bakterien entnommen und auf einer Agarplatte so ausgestrichen, dass nach Inkubation über Nacht Einzelkolonien isoliert werden konnten. Die so entstandenen Plattenkulturen sind mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging) verschlossen mehrere Wochen bei 4 °C haltbar.

Flüssigkulturen

Für die Anzucht von *E. coli* in Flüssigkultur wurde steriles LB-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und in Gegenwart entsprechender Antibiotika über Nacht bei 37 °C und 150 - 220 UpM in einem Inkubationsschüttler (New Brunswick) inkubiert. Bei Bedarf wurde die Bakterienkonzentration fotometrisch (SmartSpec™ 3000, BioRad), bei einer Wellenlänge von 600 nm, gegen das Medium bestimmt (1 OD₆₀₀ = 8 × 10⁸ Zellen/ml). *E. coli*-Kulturen, die ein für E1B-55K kodierendes Plasmid enthielten, wurden bei 30 °C und 150 - 220 UpM inkubiert.

Glyzerinkultur

Die Bakterien einer Einzelkolonie wurden in Flüssigkultur genommen und vor Erreichen der stationären Phase abzentrifugiert (4000 UpM, 10 min; Rotixa 120R, Hettich). Das entstandene Sediment wurde in 0,5 ml LB-Medium resuspendiert und in *CryoTubes*™ (Nunc) mit 0,5 ml sterilem Glyzerin vermischt. Die so erhaltenen Dauerkulturen sind nahezu unbegrenzt bei -80 °C haltbar.

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

Antibiotika- Stammlösungen	• autoklavieren	Ampicillin (500 x)	50 mg/ml in H ₂ O _{bid}
		Kanamycin (200 x)	10 mg/ml in H ₂ O _{bid}
	• sterilfiltrieren		
		• bei -20 °C lagern	

4.1.2 Transformation von *E. coli*

4.1.2.1 Transformation durch Elektroporation

Die Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach Sharma und Schimke (1996). 1 l YENB-Medium wurde mit 10 ml einer frischen Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,9 bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden 5 min auf Eis gekühlt und anschließend 10 min bei 6000 UpM und 4 °C (Centrikon T-124, Kontron Instruments) abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde daraufhin zweimal mit 100 ml eiskaltem H₂O_{bid} und einmal mit 20 ml 10%igem Glycerin gewaschen. Es wurde dann in einem Endvolumen von 3 ml 10%igem Glycerin aufgenommen, in Aliquots von je 50 µl aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

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

Für die Elektroporation von Ligationsansätzen (4.3.7.2) 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 mit 14000 UpM (Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) bei RT wurde das Sediment mit EtOH_{75%} gewaschen, getrocknet und in 10 µl H₂O_{bid} aufgenommen. Die elektrokompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl der Zellsuspension mit 1 - 10 µl Plasmid-DNA vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (BioRad) 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 auf 37 °C vorgewärmten YENB-Medium aus den Küvetten gespült, in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt und 1 h bei 37 °C bebrütet. Dann wurden sie abzentrifugiert (8000 UpM, 30 s; Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf), in ca. 50 µl LB mit entsprechenden Antibiotika resuspendiert und auf LB-Nährböden mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

4.2 Säugerzellen

4.2.1 Kulturbedingungen und Lagerung von Säugerzellen

4.2.1.1 Kultivierung von etablierten Säugerzellen als Einschichtkulturen

Adhärente Zellen wurden als Einschichtkulturen in liegenden Polystyrolflaschen (Falcon) oder Petrischalen (Falcon) kultiviert. Als Nährmedium diente *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM; Gibco BRL; Dulbecco und Freeman, 1959) mit 0,11 g/l Natriumpyruvat. Das Medium wurde mit 10% fötalem Kälberserum (FKS; Pan) angereichert und mit 1% einer Penicillin/Streptomycin-Lösung (1000 U/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin in 0,9% NaCl; Pan) versetzt. Zur Inhibition von Komplementfaktoren im fötalen Kälberserum wurde dieses vor Gebrauch aufgetaut und 30 min bei 56 °C inaktiviert. Die Zellen wurden bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator (Heraeus) mit 7%iger CO₂-Atmosphäre inkubiert und regelmäßig mit frischem Medium versorgt. Alle 3 - 5 Tage (abhängig von der Zelldichte) wurden die Zellen im Verhältnis 1:4 bis 1:10 subkultiviert.

Dazu wurde das Medium entfernt, die adhärennten Zellen mit sterilem PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (Pan) von den Zellkulturgefäßen abgelöst. Nach Kompetition der Proteaseaktivität des Trypsins durch Zugabe von 1 Vol. angereichertem Medium wurden die abgelösten Zellen in einem Polystyrol-Röhrchen (Greiner) abzentrifugiert (2000 UpM, 3 min, RT;

Rotixa 120R, Hettich). Der Überstand wurde anschließend abgesaugt und die Zellen in einem kleinen Volumen angereichertem DMEM resuspendiert. Danach wurden die Zellen in einem geeigneten Verhältnis auf neue Kulturgefäße verteilt, welche bereits vorgewärmtes Medium mit 10% FKS enthielten.

PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	NaCl	140 mM
	KCl	3 mM
	Na ₂ HPO ₄	4 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
	• pH 7,0 – 7,7 einstellen	
	• autoklavieren	

4.2.1.2 Gewinnung und Kultivierung primärer Rattennierenzellen

Zur Gewinnung primärer Rattennierenzellen wurden die Nieren von 4 – 6 Tage alten *Sprague-Dawley*-Ratten unter semisterilen Bedingungen entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in einem 50 ml Reaktionsgefäß (Greiner) mit sterilem PBS bei RT aufbewahrt.

Die Nieren wurden dann unter sterilen Bedingungen mit Pinzette und Skalpell in einer Petrischale mit sterilem PBS mechanisch zerkleinert und in ein 50 ml Reaktionsgefäß (Greiner) überführt. Je 20 Nieren wurden in 20 ml sterilem PBS mit 1 mg/ml Kollagenase/Dispase (Roche) bei 37 °C für 3 – 4 h unter mehrmaligem Schütteln im Brutschrank inkubiert. Nach Zentrifugation (2000 UpM, 4 °C, 10 min; Rotixa 120R, Hettich) wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet zweimal mit je 20 ml sterilem PBS gewaschen und in angereichertem DMEM-Medium (4.2.1.1) resuspendiert und kultiviert. Schließlich wurden pro 175 cm²-Zellkulturflasche (Falcon) die Zellen von je 4 Nieren in vorgewärmtem Medium mit 10% fötalen Kälberserum ausgesät und im CO₂-Brutschrank (Heraeus) in 7%iger CO₂-Atmosphäre bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt und die Zellen wie beschrieben (4.2.1.1) weiterkultiviert.

4.2.1.3 Lagerung von Säugerzellen

Für die dauerhafte Lagerung von Säugerzellen wurden subkonfluente Zellen nach vorheriger Ablösung durch Trypsin/EDTA (4.2.1.1) 3 min bei RT und 2000 UpM (Rotixa 120R, Hettich) zentrifugiert und das Zellsediment in 1 ml fötalem Kälberserum mit 10% DMSO (Sigma) aufgenommen und in 1,8 ml *CryoTubes*TM (Nunc) überführt. Die Zellen wurden dann schrittweise eingefroren (2 h bei -20°C, 24 h bei -80 °C) und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zur Rekultivierung wurden die tiefgefrorenen Zellen rasch bei 37 °C aufgetaut und in ein 15 ml Reaktionsgefäß (Greiner) mit 10 ml vorgewärmtem Medium überführt und bei 37 °C wie unter 4.2.1.1 beschrieben kultiviert.

4.2.2 Bestimmung der Gesamt-Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurden die Zellen trypsiniert (4.2.1.1) und je nach Zelldichte verdünnt. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurde ein 100 µl Aliquot der Zellsuspension mit 1 Vol. Trypanblau-Lösung versetzt, wobei der Farbstoff nur in abgestorbene Zellen eindringen kann und lebende Zellen farblos bleiben. Nachdem das Aliquot nach Angaben des Herstellers in die Zählkammer überführt worden war, wurden die Zellen aus 16 Kleinquadraten des kammereigenen Rasters im Lichtmikroskop (Leica DM IL) ausgezählt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung ergibt sich nach Multiplikation der Zellzahl mit dem Faktor 10⁴ die Anzahl der Zellen pro ml Gesamtkultur.

Trypanblau-Lösung	Trypanblau	0,15%
	NaCl	0,85%

4.2.3 Transfektion von Säugerzellen

4.2.3.1 Kalziumphosphat-Methode

Adhärente Säugerzellen wurden nach der Kalziumphosphat-Methode (Shaw *et al.*, 2002) in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (*6-well* Schale; Falcon) oder Zellkulturpetrischalen mit einem Durchmesser von 100 mm (Falcon) transfiziert. Die Methode beruht auf der Ausbildung von Kalziumphosphat-Kristallen, welche die zu transfizierende DNA einschließen, an der Zelloberfläche adsorbieren und endozytiert werden.

Die Zellen wurden mit einer Dichte von $2,5 \times 10^4$ Zellen/cm² ausgesät und 20 – 24 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert (4.2.1.1), so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 40 – 60% hatten. Eine Stunde vor Transfektionsbeginn wurde das Medium gewechselt. Für die Transfektion einer 100 mm-Petrischale wurden 30 µg Gesamt-DNA in 500 µl Gesamtvolumen aus sterilem H₂O_{bid} und 250 mM CaCl₂ aufgenommen und in Polystyrol-Reaktionsröhrchen (Falcon) unter leichtem Mischen (Vortex, 1000 UpM) langsam zu 500 µl 2 x BBS zugetropft. Für die Transfektion einer Zellkulturschale mit sechs Vertiefungen (*6-well* Schale; Falcon) wurden 10 µg Gesamt-DNA in 300 µl Gesamtvolumen aus sterilem H₂O_{bid} und 250 mM CaCl₂ aufgenommen und in Polystyrol-Reaktionsröhrchen (Falcon) unter leichtem Mischen (Vortex, 1000 UpM) langsam zu je 300 µl 2 x BBS zugetropft. Nachdem die Röhrchen für die Ausbildung des Präzipitats 15 min bei RT inkubiert worden waren, wurde der Inhalt auf die Zellen getropft und kurz geschwenkt. Nach ca. 24 h im Brutschrank wurde das Medium gewechselt und die transfizierten Zellen je nach Versuchsansatz entsprechend weiterkultiviert.

2 x BBS (<u>B</u> ES <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)	BES	50 mM
	NaCl	280 mM
	Na ₂ HPO ₄	1,5 mM
	• pH 7,02 exakt einstellen	
	• sterilfiltrieren	

2,5 M CaCl ₂	CaCl ₂	2,5 M
	• sterilfiltrieren	

4.2.3.2 Liposomenmethode

Um möglichst gleichmäßige und reproduzierbare DNA-Mengen in eukaryotische Zellen zu transfizieren wurde das Lipofectamin-Transfektionssystem von Invitrogen benutzt. Das Prinzip dieser Methode beruht dabei auf der spontanen Anlagerung von positiv geladenen kationischen Lipiden zu Liposomen oder kleinen Vesikeln, welche die negativ geladene DNA umschließen. Diese Lipid-DNA-Komplexe fusionieren anschließend mit der Zellmembran und ermöglichen somit den Transport der DNA in die Zellen. 24 h vor der Transfektion wurden 3×10^6 adhärenente Zellen in 100 mm-Zellkulturschalen (Falcon) ausgesät und mit 8 ml Medium (DMEM, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin) kultiviert. Die Zellen waren am nächsten Tag zu 60 - 80% konfluent und wurden nach Angaben des Herstellers transfiziert. Nach 24 - 48h wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen (4.2.6) und für SDS-PAGE (4.4.4) verwendet.

4.2.4 Transformation primärer Zellen

Dazu wurden 3×10^6 primäre Rattennierenzellen, die, wie unter Punkt 4.2.1.2 beschrieben, 2 Tage vor Versuchsbeginn kultiviert worden waren, auf 100 mm-Petrischalen (Falcon) mit DMEM (10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin) ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach der Kalziumphosphat-Methode (4.2.3.1) transfiziert.

Drei Tage nach Transfektion wurden die Zellen trypsiniert (4.2.1.1) und auf jeweils drei 100 mm-Petrischalen (Falcon) ausgesät. Danach wurde jeden fünften Tag das Medium gewechselt. Nach 3 - 4 Wochen starben die meisten nicht transfizierten Zellen ab, wohingegen Zellen, in denen die adenoviralen Genprodukte exprimiert wurden, zu mehrschichtigen Zellkolonien (*Foci*) auswuchsen. Diese konnten mit Kristallviolett-Färbelösung gefärbt und ausgezählt werden. Dabei bildet die Anzahl der *Foci* ein Maß für die Effizienz mit der zelluläre und virale Onkogene den

Transformationprozess initiieren können. Alternativ dazu konnten die *Foci* auch zur Etablierung von stabilen Zelllinien genutzt werden (4.2.5).

Kristallviolett- Färbelösung		Kristallviolett	1% (w/v)
		Methanol	25% (v/v)

4.2.5 Etablierung stabil transformierter Zelllinien

Die bei 4.2.4 erhaltenen Zellkolonien (*Foci*) wurden entweder vereinigt (polyklonal) oder mit Hilfe von sterilen Glasringen (Nunc; Durchmesser: 5 mm) einzeln isoliert (monoklonal). 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 50 µl Trypsin/EDTA-Lösung (Pan) pipettiert. Nach einigen Minuten konnten die abgelösten Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt werden, in die 100 µl FKS (Pan) vorgelegt worden war. Nach anschließender Zentrifugation (5000 UpM, 3 min, RT; Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) wurden die Zellen in geeigneten Zellkulturschalen kultiviert und als Zelllinien etabliert.

4.2.6 Ernte von Säugerzellen

Für die Zellernte wurde zuerst das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Plastikschabers (Sarstedt) vom Boden der Zellkulturschale (Falcon) abgeschabt, in ein 15 ml Reaktionsgefäß (Greiner) überführt und 3 min bei RT und 2000 UpM (Rotixa 120R, Hettich) zentrifugiert. Es folgte ein Waschschrift mit 10 ml PBS und anschließender Zentrifugation (RT, 2000 UpM, 3 min; Rotixa 120R, Hettich). Das erhaltene Zellsediment wurde entweder bei -80 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

4.3 DNA-Techniken

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

Zur analytischen Isolierung kleiner Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde ein von Beck und Mitarbeiter modifiziertes Verfahren der alkalischen Lyse eingesetzt (Beck *et al.*, 1993). Dabei wurden 1,5 ml Übernachtskultur für 1 min bei 14000 UpM (Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 200 µl Puffer A resuspendiert. Die Suspension wurde dann mit 400 µl Puffer B versetzt, vorsichtig mehrmals geschwenkt, 5 min bei RT inkubiert, 300 µl Puffer C zugegeben, erneut 5 min bei RT inkubiert und anschließend ebenfalls bei RT für 10 min bei 14000 UpM (Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde in neues 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt und die DNA 10 min bei 14000 UpM (Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) gefällt. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Präzipitat mit 1 ml EtOH_{75%} gewaschen, getrocknet und in 50 µl H₂O_{bid} gelöst. Die so isolierte DNA konnte für Restriktions- und Sequenzanalysen eingesetzt werden.

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

Die präparative Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA aus 100 – 1000 ml Übernachtskultur erfolgte über Anionenaustauscher-Säulen (Qiagen) nach Anweisungen des Herstellers.

4.3.2 Präparation genomischer DNA aus kultivierten Zellen

Die Präparation genomischer DNA aus kultivierten Zellen erfolgte mit Hilfe des DNeasy Tissue Systems der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

4.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA wurde mit Hilfe des SmartSpec™ 3000-System von BioRad mit einer zugehörigen Quarzküvette (BioRad) bei 260 nm vermessen. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Absorption von 1,0 im Absorptionsmaximum bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml. Für einzelsträngige Oligonukleotide gilt die Näherungsformel $1 \text{ OD}_{260} = 20 \text{ µg/ml}$.

4.3.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Proben wurden sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke in 0,6 - 1,5%igen Agarosegelen (w/v) elektrophoretisch aufgetrennt. Hiefür wurde eine entsprechende Menge Agarose (*Seakem® LE agarose*, FMC Bioproducts) in einer Mikrowelle (Moulinex) in 1 x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst, auf ca. 50 °C abgekühlt und zur späteren Färbung der DNA mit 50 ng/ml Ethidiumbromid versetzt. Die noch flüssige Agarose-Gellösung wurde dann in eine vorbereitete Flachbettgelapparatur gegossen. Die DNA-Proben wurden mit jeweils $\frac{1}{6}$ Vol. Auftragspuffer versetzt und auf das verfestigte Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 5 - 10 V/cm. Analytische Gele wurden auf einem UV-Durchlichtschirm (Bachofer) bei einer Wellenlänge von 312 nm visualisiert und mit einem Geldokumentationssystem (Gel Print 2000i, MWG-Biotech) dokumentiert. Bei präparativen Gelen wurde zur Schonung der DNA mit langwelligem UV-Licht (365 nm) angeregt, und die entsprechenden DNA-Banden ausgeschnitten. Um die DNA-Schäden durch UV-Licht weiter zu minimieren wurde bei präparativen Gelen zusätzlich 1 mM Guanosin in die Gellösung eingebracht.

10 x TBE	Tris	85 mM
	Borsäure	890 mM
	EDTA	4,7 mM
	vor Gebrauch entsprechend verdünnt	
DNA-Auftrags-Puffer	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
	Xylencyanol	0,25% (w/v)
	Glyzerin	50% (v/v)
	EDTA	10 mM
Ethidiumbromid-Stammlösung	Ethidiumbromid	10 mg/ml
	• Lagerung bei 4 °C, lichtgeschützt	

4.3.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von kleineren DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des *Gel Extraction Kits* von Qiagen über Anionenaustauscher-Säulen nach Angaben des Herstellers. Vorhergehend wurden die zu präparierenden DNA-Banden unter langwelligem UV-Licht (365 nm) mit einem Skalpell aus dem mit Ethidiumbromid gefärbten Gel ausgeschnitten. Nach der Isolierung konnte die Konzentration und Qualität der DNA-Lösung über Agarose-Gelelektrophorese (4.3.4) eines Aliquots überprüft werden.

Da bei der Reinigung der DNA über Anionenaustauscher-Säulen die Anzahl der Strangbrüche proportional zur Größe des zu reinigenden DNA-Fragmentes zunimmt, ist diese Methode nur für kleinere DNA-Stücke sinnvoll. Für die Isolierung von DNA-Fragmenten größer 10 kb wurde daher ein alternatives Verfahren verwendet. Dabei wurde ein Agaroseblock mit der zu präparierenden DNA-Bande zunächst unter langwelligem UV-Licht (365 nm) aus einem 0,6%igen Gel ausgeschnitten und anschließend für 2 h bei RT und 20000 UpM im SS34-Rotor (Centrikon T-124, Kontron Instruments) zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde dann mit $1/10$ Vol. 3 M NaOAc und 1 Vol. Isopropanol gefällt, das DNA-Pellet

in 40 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgenommen und die Konzentration und Qualität der DNA-Lösung über Agarose-Gelelektrophorese (4.3.4) eines Aliquots überprüft.

4.3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Standard-PCR-Ansatz

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) (Saiki *et al.*, 1988) ist ein Verfahren zur exponentiellen Vermehrung (Amplifikation) definierter Nukleinsäure-Sequenzen *in vitro*.

Für einen 50 µl Standard-Reaktionsansatz wurden ca. 100 ng Plasmid-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 5 U thermostabile *Taq*-DNA-Polymerase (Roche). Dieser Ansatz wurde in dünnwandigen 0,2 ml Reaktionsgefäßen (Biozym) in einem Thermocycler (*GeneAmpTMPCR 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 pro kb bei	72 °C	Polymerisation

Dieser Zyklus wurde 30mal durchlaufen, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation bei 72 °C um 3'-Enden nicht vollendeter PCR-Produkte aufzufüllen. 5 µl der so amplifizierten DNA wurden auf einem Agarosegel elektrophoretisch (4.3.4) aufgetrennt und unter UV-Licht hinsichtlich Fragmentgröße und Ausbeute überprüft.

Einführen von Mutationen durch PCR

Die In-vitro-Punktmutagenese rekombinanter Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) nach den Anweisungen des Herstellers. Dazu wurde ausgehend von zwei komplementären Oligonukleotiden,

welche die gewünschten Mutationen in der Zielsequenz enthielten, das gesamte Plasmid amplifiziert. Die Zyklen-Abfolge war dabei wie folgt:

30 s bei	95 °C	Aufschmelzen der DNA
1 min bei	55 °C	Hybridisieren der Oligonukleotide an die Zielsequenz
2 min pro kb bei	68 °C	Polymerisation

4.3.7 Klonierung von DNA-Fragmenten

4.3.7.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme

Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen New England Biolabs und Roche bezogen und zusammen mit den dazu gehörigen 10 x Puffern nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Um Pufferunverträglichkeiten bei der Spaltungen mit mehreren Enzymen zu umgehen, wurde die DNA gegebenenfalls nach jedem einzelnen Verdau mit $1/10$ Vol. 3 M NaOAc und 1 Vol. Isopropanol gefällt und erneut in H_2O_{bid} aufgenommen. Für analytische Spaltungen wurden in der Regel 0,5 - 1 µg DNA sowie je 3 - 10 U Restriktionsenzym eingesetzt und, falls nicht anders angegeben, 2 h bei 37 °C inkubiert. Präparative Restriktionsspaltungen enthielten 5 - 20 µg DNA und je 50 U Enzym, bei einer Inkubation bei 37 °C für mindestens 2 h. Zu spaltende PCR-Produkte wurden nach der PCR-Reaktion zunächst über NaOAc/Isopropanolfällung von nicht inkorporierten Oligonukleotiden und dNTPs gereinigt und konzentriert und anschließend durch Restriktionsenzyme gespalten. Nach Spaltung der verschiedenen Ausgangs-DNAs wurden die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt (4.3.4) und gegebenenfalls aus dem Gel gereinigt (4.3.5).

4.3.7.2 Ligation und Transformation

Mit Restriktionsenzymen linearisierte Vektor-DNA wurde, um eine Religation des Vektors zu verhindern, direkt im Anschluss an deren Spaltung entweder mit 1 U alkalischer Phosphatase (SAP, *shrimp alkaline phosphatase*, Roche) für 30 min bei 37 °C

oder mit 5 U tsAP (*thermosensitive alkaline phosphatase*, Roche) für 30 min bei 37 °C und anschließend mit 65 °C für 45 min dephosphoryliert. DNA-Fragmente wurden vor der Ligation jeweils, wie unter 4.3.5 beschrieben, aufgereinigt und deren Konzentration abgeschätzt. Ein Standard-Ligationsansatz enthielt 20 - 100 ng Vektor-DNA sowie die drei- bis fünffache molare Menge an zu klonierender Fremd-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 4 µl 5 x Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase (Roche). Für die kovalente Verknüpfung der Phosphodiesterbrücken wurde der Ansatz über Nacht bei 13 °C inkubiert und anschließend zur Transformation in *E. coli* (4.1.2.1) eingesetzt.

4.3.7.3 Identifizierung rekombinanter Klone

Ausgehend von den transformierten *E. coli*, die auf LB-Agarplatten mit geeigneten Antibiotika wuchsen, wurden Einzelkolonien mit einem sterilen Zahnstocher in LB-Flüssigmedium mit geeigneten Antibiotika überimpft und über Nacht bei 37 °C mit 220 UpM inkubiert. Plasmid-DNA wurde durch alkalische Lyse (4.3.1) präpariert und in 50 µl H₂O_{bid} aufgenommen. Je 5 µl davon wurden durch Spaltung mit geeigneten Restriktionsenzymen (4.3.7.1) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese (4.3.4) analysiert. Die so identifizierten rekombinanten Klone wurden durch DNA-Sequenzierung (4.3.8) überprüft und als Glyzerinkultur (4.1.1) aufbewahrt.

4.3.8 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung eines Plasmids kleiner 8 kb wurden 500 ng Plasmid-DNA und 6 pmol des entsprechenden Oligonukleotids mit H₂O_{bid} auf ein Endvolumen von 8 µl aufgefüllt. Bei der Sequenzierung von genomischer DNA wurden 2,5 µg DNA und 25 pmol des entsprechenden Oligonukleotids in 6 µl Endvolumen eingesetzt. Die DNA-Sequenzierungen dieser Arbeit wurden von der Firma Genart (Regensburg) durchgeführt.

4.4 Protein-Techniken

4.4.1 Expression rekombinater Proteine in *E. coli*

Die Expression rekombinater Proteine in *E. coli* erfolgte als Fusion mit Glutathion S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* (Smith und Johnson, 1988). Der GST-Anteil ermöglicht eine rasche affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen. Das zu exprimierende Fremdgen stand dabei unter der Kontrolle des *lac*-Promotors. Dieser wird vom *lac*-Operator reguliert an dem unter normalen Wachstumsbedingungen der *lac*-Repressor bindet und dadurch die Transkription des Fremdgens blockiert. Durch chemische Induktion mit dem Lactose-Analogen Isopropylthio- β -D-galactosid (IPTG) wird die Bindung des *lac*-Repressors an dessen Zielsequenz verhindert und nach dessen Dissoziation die Expression plasmidkodierter Gene induziert. Durch diese Expressionskontrolle können toxische Effekte der rekombinaten Genprodukte, die zu verringertem Zellwachstum und Instabilität der Expressionsvektoren führen, verhindert werden.

Expression

Für die Fremdproteinsynthese wurde zunächst eine Übernachtskultur in LB-Medium (4.1.1) mit entsprechenden Antibiotika 1:10 in vorgewärmtem Medium verdünnt und bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,6 - 0,8 bei 220 UpM (New Brunswick) weiter geschüttelt. Zur Induktion wurde der Kultur 1 mM IPTG zugegeben und für weitere 4 h bei 37 °C inkubiert.

Gewinnung von Einschlusskörpern (*inclusion bodies*)

Die induzierte Bakterienkultur wurde zentrifugiert (6000 UpM, 10 min, 4 °C; Centrikon T-124, Kontron Instruments), das Sediment gewogen und in Puffer I (25 ml Puffer I pro 5 g Pellet) resuspendiert. Nach der Zugabe von 1,5 mg Lysozym pro g Pellet wurde das Homogenisat 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend dreimal je 1 min mit Ultraschall (*output* 0,60; 0,8 Impulse/s; Branson Sonifier 450)

behandelt. Danach wurde $MgCl_2$ zu einer Endkonzentration von 3 mM und DNase I bis zu einer Endkonzentration von 10 $\mu g/ml$ zugegeben und 30 min bei RT inkubiert, um die DNA zu entfernen. Nach der Zugabe von 0,5 Vol. Puffer II wurde die Suspension erneut 30 min bei 4 °C inkubiert und abschließend zur Isolierung der *inclusion bodies* zentrifugiert (20000 UpM, 10 min, 4 °C; Sorvall RC-5B Plus, SS34-Rotor). Das *inclusion body* Pellet wurde mit 40 ml Puffer III gewaschen, erneut zentrifugiert (20000 UpM, 10 min, 4 °C; Sorvall RC-5B Plus, SS34-Rotor) und gewogen und konnte dann entweder zwei Wochen bei -20 °C gelagert werden oder direkt zur Solubilisierung der Proteine eingesetzt werden.

Puffer I	Tris/HCl, pH 7,0 EDTA	0,1 M 1 mM
Puffer II	EDTA Triton X-100 NaCl, pH 7,0	60 mM 6% (v/v) 1,5 M
Puffer III	Tris/HCl, pH 7,2 EDTA	0,1 M 20 mM

Solubilisierung von Proteinen aus Einschlusskörpern (*inclusion bodies*)

50 mg des *Inclusion body*-Pellet wurde in 5 ml Puffer A resuspendiert und 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde der pH-Wert der Suspension durch tropfenweise Zugabe von 1 M HCl auf einen Wert zwischen 3-4 gesenkt und die unlöslichen Zelltrümmer durch Zentrifugation (7000 UpM, 10 min, 4 °C; Sorvall RC-5B Plus, SS34-Rotor) abgetrennt. Um das DTT in der Suspension vollständig zu entfernen, wurde zweimal 2 h bei RT gegen 500 ml Puffer B und einmal über Nacht bei 4 °C gegen 1 l Puffer C unter Einsatz von Slide-A-Lyzer® Dialysekassetten (Pierce) nach Anweisungen des Herstellers dialysiert. Am nächsten Tag wurde die Proteinkonzentration wie unter 4.4.3 unter Verwendung einer denaturierten BSA-Probe (BSA gelöst in Puffer C) als Eichprotein gemessen. Die Proteinproben konnten mehrere Wochen bei -80 °C aufbewahrt werden.

Puffer A	Tris/HCl, pH 8,0	0,1 M
	Harnstoff	8 M
	DTT	100 mM
	EDTA	1 mM
Puffer B	Harnstoff	6 M
	HCl	10 mM
Puffer C	Harnstoff	6 M

4.4.2 Gesamtzellextrakt aus Säugerzellen

Die Zellen einer 100 mm-Petrischale (Falcon) wurden in einer entsprechenden Menge gekühltem Lysepuffer (4.4.6) resuspendiert und dann 30 min auf Eis gestellt. Um einen vollständigen Zellaufschluss zu gewährleisten, wurden die Zellysate zweimal für 30 s mit Ultraschall (*output* 0,60; 0,8 Impulse/s; Branson Sonifier 450) behandelt, wobei die Reaktionsgefäße (Greiner) zwischen den Sonifikationsschritten auf Eis gelagert wurden. Größere Zellfragmente wurden durch Zentrifugation (4000 UpM, 10 min, 4 °C; Rotixa 120R, Hettich) abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) transferiert und für weitere Experimente verwendet.

4.4.3 Quantitative Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration löslicher Proteine einer Probe wurde mit Hilfe des *Protein-Assays* (BioRad) bestimmt. Dieses Testverfahren, das auf der Proteinquantifizierung nach Bradford beruht (Bradford, 1976), misst die auftretende Absorptionzunahme bei 595 nm, nachdem die vorhandenen Proteine an das chromogene Substrat dieses Testsystems gebunden haben. Die Proteinkonzentration in der Probe lässt sich durch Vergleich der gemessenen OD₅₉₅ mit den Werten einer Eichkurve ermitteln. Unterschiedliche Verdünnungen der zu bestimmenden Proteinprobe und 1–10 µg des Eichproteins BSA (Rinderserumalbumin, Sigma) wurden in Polystyrol-Küvetten

(Sarstedt) mit PBS jeweils auf ein Gesamtvolumen von 800 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 200 µl Färbereagenz 5 - 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm fotometrisch gegen den Nullwert (800 µl PBS + 200 µl Färbereagenz) bestimmt.

4.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

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 die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine zur Anode primär durch deren Proteingröße bestimmt wird. Nach Laemmli werden die Proteine unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel konzentriert und wandern von dort gemeinsam in das Trenngel ein (Laemmli, 1970).

Durchführung

Der Aufbau der Gelapparaturen und das Gießen der Gele erfolgten entsprechend den Angaben der Hersteller. Die genaue Zusammensetzung der benötigten Gellösungen sind unten aufgeführt (Harlow und Lane, 1988).

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 1 Vol. 2 x SDS-Probenpuffers (Sambrook *et al.*, 1989) versetzt im Falle von E1B-haltigen Proben 12 min bei 55 °C in allen anderen Fällen 3 min bei 95 °C denaturiert. Als Standard wurde der vorgefärbte Marker *precision protein standard* (BioRad) benutzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 20 mA pro Gel in TGS-Puffer bis die Bromphenolblau-Bande das Ende des Gels erreichte. Im Anschluss an die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese konnten die aufgetrennten Proteine über *Western Blot*-Analysen (4.4.5) 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 (8%)	Acrylamid-Stammlösung	27% (v/v)
	Tris/HCl, pH 8,8	250 mM
	SDS	0,1% (w/v)
	APS	0,1% (w/v)
	TEMED	0,06% (v/v)
Trenngel (10%)	Acrylamid-Stammlösung	34% (v/v)
	Tris/HCl, pH 8,8	250 mM
	SDS	0,1% (w/v)
	APS	0,1% (w/v)
	TEMED	0,04% (v/v)
TGS-Puffer	Tris	25 mM
	Glycin	200 mM
	SDS	0,1% (w/v)
2 x SDS-Probenpuffer	Tris/HCl, pH 6,8	100 mM
	SDS	4% (w/v)
	DTT	200 mM
	Bromphenolblau	0,2% (w/v)
	Glyzerin	20%

4.4.5 Western Blot

Proteintransfer auf Nitrozellulose

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden diese nach Auftrennung über Polyacrylamidgele (4.4.4) nach dem *Western Blot*-Verfahren auf Nitrozellulose-Membranen (Protran, Schleicher & Schuell) übertragen. Der Transfer erfolgte mit Hilfe einer *Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell* (BioRad) nach Anleitung des Herstellers in *Towbin*-Puffer bei einer Stromstärke von 400 mA für 90 min. Auf der

Membran immobilisierte Proteine wurden anschließend mit Ponceau S reversibel angefärbt.

Bindung des spezifischen Antikörpers

Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde die Nitrozellulose-Membran in PBS mit 5% (w/v) Magermilchpulver (Glücksklee) über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Anschließend wurde die Membran in einer Lösung des spezifischen Antikörpers (Verdünnung in PBS-Tween mit 1% (w/v) Magermilchpulver) für 1 h bei RT inkubiert. Nach der Bindung des primären Antikörpers wurde die Membran dreimal 5 min in PBS-Tween gewaschen und danach für 1 h in einer 1:5000 Verdünnung des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers geschüttelt. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal 5 min in PBS-Tween gewaschen. Im Anschluss folgte die Detektion über die Enzym-Substrat-vermittelte Farbreaktion.

Detektion über Enzym-Substrat vermittelte Farbreaktion

Für den spezifischen Proteinnachweis wurde das *SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce) verwendet. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip der verstärkten Chemilumineszenz unter Beteiligung des Enzyms HRP und stellt ein nicht radioaktives Nachweisverfahren von hoher Sensitivität dar.

Hierfür wurden nach Abgießen des letzten Waschpuffers (nach Angaben des Herstellers) die beiden Detektionslösungen 1:1 gemischt und in einer Menge von etwa 0,125 ml/cm² auf den Nitrozellulosefilter gegeben. Nach 5 min Inkubationszeit wurde der Nitrozellulosefilter kurz abgetropft und in Folie eingeschlagen.

Die Detektion der Signale erfolgte mit Röntgenfilmen (Biomax X-OMAT™ AR, Kodak) in einer Filmkassette (Rego) mit unterschiedlichen Expositionszeiten (1 s bis 1 h). Die Röntgenfilme wurden anschließend für 3 min in Entwicklerlösung (GBX-Entwickler, Kodak) inkubiert, 1 min in H₂O_{bid} geschwenkt um die Entwicklung zu stoppen und anschließend 2 min in Fixierlösung (GBX-Fixierer, Kodak) fixiert. Danach wurden der Filme erneut in H₂O_{bid} gewaschen um Reste der Lösungen zu

entfernen und getrocknet. Die belichteten und entwickelten Filme wurden zur Dokumentation eingescannt (*scanjet 7400c*, Hewlett-Packard).

Towbin-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	0,1% (v/v)
	• in PBS	

4.4.6 Immunpräzipitation

Das Prinzip der Immunpräzipitation beruht auf der spezifischen Erkennung eines Zielproteins durch einen an eine Sepharose-Matrix gekoppelten Antikörper, was eine Isolierung der entsprechenden Proteine bzw. Proteinkomplexe ermöglicht. Die Kopplung von Antikörpern aus Maus und Kaninchen erfolgte an Protein A-Sepharose (Sigma). Protein A bindet spezifisch an den Fc-Teil von Antikörpern was eine indirekte Kopplung des Antikörpers an die Sepharose-Matrix zur Folge hat. Wenn nun ein Protein oder ein Proteinkomplex an das Epitop des gebundenen Antikörpers bindet kann dieser Protein-Antikörper-Komplex auf Grund des hohen Molekulargewichts der Sepharose ebenfalls abzentrifugiert werden. Durch Erhitzen des Präzipitats für 3 min auf 95 °C in einem geeigneten Probenpuffer werden die Protein-Protein-Wechselwirkungen aufgehoben und alle Proteine in Lösung gebracht. Diese können dann anschließend im *Western Blot* (4.4.5) detektiert werden. Durch das Präzipitieren eines Proteins mit Hilfe eines anderen, antikörpergebundenen Proteins (Kopräzipitation) ist es möglich, spezifische Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Dabei ist die Stringenz des eingesetzten Lysepuffers von maßgeblicher Bedeutung.

Durchführung

Für 10 Ansätze wurden 30 mg lyophilisierte Protein A- oder G-Sepharose in 1 ml Lysepuffer (NP-40, RIPA-*light* oder RIPA) 2 h bei 4 °C in einem Überkopfschüttler (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) äquibriert. Die Suspension wurde daraufhin 5 min bei 4 °C und 6000 UpM abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf), das Sediment in 1 ml gekühltem Lysepuffer gewaschen und in 1 ml Hybridomüberstand oder in 1 ml Lysepuffer mit 10 - 20 µg gereinigtem Antikörper aufgenommen. Die Bindung der Antikörper an die Matrix fand während der anschließenden Inkubation für 2 h bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) statt. Die Suspension wurde daraufhin erneut bei 6000 UpM für 5 min, 4 °C (Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) abzentrifugiert, die Sepharose in 1 ml gekühltem Lysepuffer gewaschen, abzentrifugiert (6000 UpM, 5 min, 4 °C; Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) und mit kaltem Lysepuffer wieder auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt. Pro Ansatz wurden 100 µl dieser Suspension mit der entsprechenden Menge Zellysat (150 - 2000 µg Gesamtprotein) gemischt und über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) inkubiert. Zur Eliminierung unspezifischer Bindungen der Proteine aus dem Zellysat mit der Sepharose-Matrix wurde der zu untersuchende Zellextrakt vorher mit je 100 µl der äquibrierten Protein A- bzw. G-Sepharose für 1 h auf einem Überkopfschüttler (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) bei 4 °C vorinkubiert und nach Zentrifugation (6000 UpM, 5 min, 4 °C; Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) für die Immunpräzipitation eingesetzt. Die nach der Immunpräzipitation erhaltene Suspension wurde abzentrifugiert (6000 UpM, 5 min, 4 °C; Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf), dreimal mit je 1 ml kaltem Lysepuffer gewaschen, zentrifugiert (6000 UpM, 5 min, 4 °C; Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) und das Sediment in 25 - 50 µl SDS-Probenpuffer (4.4.4) aufgenommen. Anschließend konnten die Proben im SDS-Polyacrylamidgel (4.4.4) aufgetrennt und weiter analysiert werden.

NP-40 (niedrige Stringenz)	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	Nonidet P-40	0,15% (v/v)
RIPA-light (mittlere Stringenz)	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	Nonidet P-40	1% (v/v)
	SDS	0,1% (w/v)
	Triton X-100	0,1% (v/v)
RIPA (hohe Stringenz)	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	Nonidet P-40	1% (v/v)
	SDS	0,1% (w/v)
	Na-Desoxycholat	0,5% (v/v)

4.4.7 Immunfluoreszenz

4.4.7.1 Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA)

Subkonfluente, adhärenente Zellen wurden in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (6-well Schale; Falcon) auf sterilen Deckgläsern oder in Petrischalen (100 mm, Falcon) auf sterilen Objektträgern bei 37 °C kultiviert. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen gegebenenfalls transfiziert (4.2.3.1) und weitere 24 - 48 h inkubiert. Zur Fixierung der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Deckgläser bzw. die Objektträger zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 2% Paraformaldehyd (in PBS) für 10 min bei RT inkubiert. Nach Entfernung des Paraformaldehyds 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% Paraformaldehyd (in PBS) für 10 min fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. In PBS war eine Lagerung der Zellen bei 4 °C für eine Woche möglich. Die anschließende Immunfärbung erfolgte wie bei 4.4.7.3 beschrieben.

4.4.7.2 Fixierung mit Methanol

Subkonfluente, adhärenente Zellen wurden wie bei 4.2.1.1 beschrieben kultiviert und gegebenenfalls transfiziert (4.2.3). Zur Fixierung der Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Deckgläser bzw. Objektträger mit PBS gewaschen und für 10 min in Methanol bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen bei RT getrocknet und konnten mehrere Wochen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder sofort für die Immunfluoreszenz (4.4.7.3) verwendet werden.

4.4.7.3 Immunologischer Nachweis

Für die Immunfluoreszenz wurden die Deckgläser auf Parafilm (Pechiney Plastic Packaging) überführt, kurz mit PBS-Tween gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Bindestellen 1 h bei RT mit TBS-BG-Puffer inkubiert. Bei Verwendung von Objektträgern wurden zuvor kreisrunde Bereiche markiert, in denen die Färbungen stattfinden sollten, und die umgebenden Flächen getrocknet, um ein Verlaufen der Antikörperlösungen zu verhindern. Die Absättigung unspezifischer Bindestellen erfolgte analog zur Deckglas-Methode. Nach Entfernung des Überstandes und einem Waschschrift in PBS-Tween wurden pro Deckglas bzw. pro Färberegion des Objektträgers $30\text{ }\mu\text{l}$ Primärantikörper (geeignete Verdünnung in PBS) zugegeben und 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Dann wurden die Zellen dreimal in PBS-Tween gewaschen und anschließend 1 h abgedunkelt mit $30\text{ }\mu\text{l}$ Sekundärantikörper inkubiert. Fluoreszenzgekoppelte, sekundäre Antikörper wurden als 1:100 Verdünnung in PBS verwendet, wobei zur Anfärbung des Chromatins $0,5\text{ }\mu\text{g/ml}$ DAPI (4',6-Diamidin-2'-Phenylindol Dihydrochlorid) zugesetzt wurde. Nichtgebundener zweiter Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS-Tween entfernt. Sämtliche Inkubationsschritte wurden bei RT durchgeführt. Die Deckgläser wurden nun mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf einen neuen Objektträger gelegt und mittels *Glow Mounting Medium* (EnerGene) eingebettet. Bei den zellbewachsenen Objektträgern war die Vorgehensweise genau umgekehrt. Hierbei wurden die bewachsenen Objektträger mit der Zellseite nach

oben gelegt, mit *Glow Mounting Medium* (EnerGene) versehen und mit neuen Deckgläsern bedeckt. Die Versuchsansätze konnten nun abgedunkelt bei 4 °C mehrere Tage bis wenige Wochen gelagert werden.

Die weitere Analyse erfolgte mit Hilfe eines institutseigenen Leica DMR Fluoreszenzmikroskops mit digitalem Bildverarbeitungssystem (Spot RT, Diagnostic Instruments; Metavue 4.6, Visitron Systems).

TBS-BG	Tris/HCl, pH 7,6	20 mM
	NaCl	137 mM
	KCl	3 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
	Tween 20	0,05% (v/v)
	Natrium-Azid	0,05% (w/v)
	Glycin	5% (w/v)
	BSA	5% (w/v)

4.4.8 Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen den C-Terminus von E1B-55K

Die kodierende Sequenz für die letzten 150 AS von E1B-55K wurde in den Leserahmen des Expressionsplasmids pGEX-2T kloniert (4.3.7) und das Ligationsprodukt in elektrokompetente *E. coli* TOPP™ 5 transformiert (4.1.2.1). Das Fusionsprotein aus GST und dem C-Terminus von E1B-55K wurde wie unter 4.4.1 beschrieben exprimiert und aufgereinigt. Die Immunisierung von Ratten und Isolierung von Hybridomzellen und -überständen wurde von Frau Dr. Elisabeth Kremmer (GSF München) durchgeführt.

4.5 Reporterversuche

Zur quantitativen Bestimmung von Promotoraktivitäten wurde das *Dual-Luciferase*® Reporter Assay System (Promega) nach Anweisungen des Herstellers verwendet. Die Reporterplasmide pRE-LUC, pcyclinG-LUC und pGalTK-Luc enthalten das *Firefly-*

Luziferase-Gen aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* unter der Kontrolle eines p53-abhängigen Promotors (pRE-LUC und pcyclinG-LUC) oder eines Promotors mit Gal4-DNA-Bindungssequenz (pGalTK-Luc). Die Reporterkonstrukte wurden zusammen mit verschiedenen Mengen von E1B-55K-Expressionskonstrukten (E1B-55K oder Fusionen mit der Gal4-DNA-Bindungsdomäne) und einem p53-Expressionskonstrukt pC53SN3 (bei pRE-LUC und pcyclinG-LUC) in p53^{-/-} H1299-Zellen transfiziert. So konnten die Auswirkungen der E1B-55K-Polypeptide auf die Promotoraktivität untersucht werden. Als interne Kontrolle wurde zusätzlich der Vektor pRL-TK transfiziert, der das *Renilla*-Luziferase-Gen aus *Renilla reniformis* unter Kontrolle des konstitutiven Thymidin-Kinase-Promotors enthält. Beide Luziferasen sind unter unterschiedlichen Bedingungen aktiv und können somit unabhängig voneinander angeregt und vermessen werden. Die Messung der *Renilla*-Luziferase (pRL-TK) wurde dazu benutzt die verschiedenen Lysate zu normieren und der Wert der Promotoraktivität wurde als Quotient aus *Firefly*-Luziferase-Aktivität zu *Renilla*-Luziferase-Aktivität berechnet.

Für die Versuche wurden 1×10^5 H1299-Zellen in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (6-well Schale; Falcon) ausgesät und am nächsten Tag mit 0,1 µg pRL-TK, 0,25 µg Reporterplasmid (pRE-LUC, pcyclinG-LUC oder pGalTK-Luc) 25 ng pC53SN3 (nur im Falle von pRE-LUC und pcyclinG-LUC) sowie unterschiedlichen Mengen an E1B-Expressionskonstrukten (basierend auf pcDNA3 für pRE-LUC und pcyclinG-LUC oder basierend auf pG4 für pGalTK-Luc) mit der Liposomenmethode transfiziert (4.2.3.2). Nach 48 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, 300 µl *passive lysis buffer* (Promega) pro Ansatz auf die Zellen gegeben und 20 min bei RT inkubiert. Durch Pipettieren wurden die Zellen daraufhin vollständig abgelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff vollständig lysiert. Nach dem Auftauen wurden die Zellfragmente bei RT für 5 min bei 14000 UpM (Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) abzentrifugiert und der Überstand konnte bei Bedarf für 2 Wochen bei -20 °C gelagert werden. Alle weiteren Arbeitsschritte zur

Ermittlung der Promotoraktivität wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und die Promotoraktivitäten mit einem Luminometer (Lumat LB 9507, Berthold) bestimmt.

4.6 Tumorigenitätstest in Nacktmäusen

Die zu testenden transformierten Zelllinien wurden wie unter 4.2.1.1 beschrieben mittels Trypsin/EDTA-Lösung von den Zellkulturschalen gelöst, zweimal mit PBS gewaschen und in serumfreiem DMEM-Medium resuspendiert, so dass die Suspension eine Konzentration von $1,6 \times 10^7$ Zellen/ml besaß. NMRI (*nu/nu*) Nacktmäusen mit einem mittleren Körpergewicht von 20 g wurden $1,6 \times 10^6$ Zellen subkutan injiziert und das Tumorwachstum wöchentlich an der Injektionsstelle durch Messung des Tumordurchmessers dokumentiert. Die Tumorgröße wurde als Produkt aus zwei Durchmessern berechnet, wobei einer davon an der breitesten Stelle des Tumors gemessen wurde. Aus ethischen Gründen wurden die Mäuse sechs Wochen nach Injektion oder bei Erreichen einer Maximaltumorgröße von 300 mm^2 getötet. Zur Rekultivierung und Analyse der Tumorzellen wurde der komplette Tumor unter semisterilen Bedingungen entnommen, das Tumorgewebe entsprechend der Vorgehensweise bei der Gewinnung primärer Rattennierenzellen mechanisch und enzymatisch behandelt (4.2.1.2) und die präparierten Zellen unter Zellkulturbedingungen (4.2.1.1) kultiviert. Die Injektion der Zellen und die tierärztliche Betreuung des Versuchs wurden vom Tierarzt Dr. Thilo Spruss am Tierstall der Universität Regensburg durchgeführt.

5.1 Analyse des nukleären Exports von E1B-55K im Kontext der Zelltransformation

Das 55K-Genprodukt der frühen Region 1B (E1B-55K) von Ad5 ist ein multifunktionelles Phosphoprotein, das eine zentrale Rolle im Ad5-vermittelten Transformationsvorgang primärer Zellen einnimmt. Nach heutigem Wissensstand liegen den onkogenen Aktivitäten des E1B-Proteins verschiedene Wirkmechanismen zugrunde, die über die Modulation zellulärer Regulatoren der Zellzykluskontrolle und Apoptose vermittelt werden. Im Vordergrund steht dabei die Inaktivierung des zellulären Tumorsuppressorproteins p53 auf der Ebene der Transkription. Als weitere Faktoren werden p53-unabhängige Funktionen und eine intrinsische nukleozytoplasmatische *Shuttle*-Aktivität vermutet (zur Übersicht: Endter und Dobner, 2004). Soweit bekannt erfolgt auf molekularer Ebene der Kernexport von E1B-55K über ein Leucin-reiches, CRM1-abhängiges Kernexportsignal (NES, *nuclear export signal*) während der Kernimport durch kovalente Verknüpfung mit SUMO1 an einem zum E1B-NES eng benachbarten SUMO-Konjugationsmotiv (SKM) reguliert wird (Endter *et al.*, 2001). Nach einem vorläufigen Modell bewirkt diese Pendelfunktion eine Inaktivierung von p53 und möglicherweise anderen Kernproteinen durch zytoplasmatische Sequestration und könnte darüber hinaus mit der Ausbildung der charakteristischen perinukleären E1B/p53-Proteinstrukturen (*perinuclear body*) in Verbindung stehen, die in allen Subgruppe C Ad E1A/E1B-transformierten Zellen beobachtet werden. Diese Hypothese wird zumindest teilweise durch die Tatsache unterstützt, dass die Inaktivierung des Kernimportsignals im SKM die E1B-vermittelte Repression p53-stimulierter Transkription aufhebt und auch die transformierenden bzw. onkogenen Eigenschaften des viralen Proteins deutlich reduziert (Endter *et al.*, 2001). Im Unterschied dazu, kann über die Rolle der NES-abhängigen Kernexportfunktion derzeit noch keine Aussage gemacht werden. Es wird jedoch vermutet, dass diese Aktivität, analog zum Kernimport, einen wichtigen Mechanismus darstellt über den E1B-55K den antiproliferativen

Funktionen von p53 entgegenwirkt und damit eine Schlüsselrolle in der E1B-induzierten Onkogenese spielt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Aminosäureaustauschen im E1B-NES auf den E1A/E1B-vermittelten Transformationsvorgang primärer Zellen untersucht und die biochemischen Eigenschaften der E1B-NES-Mutante im Detail auf molekularer Ebene in transient transfizierten und stabil transformierten Rattenzellen analysiert.

5.1.1 E1B-55K pendelt in primären Rattennierenzellen

Bisherige Arbeiten zur CRM1-vermittelten Kernexportfunktion von Ad5 E1B-55K wurden ausschließlich in human Zellen durchgeführt (Krätzer *et al.*, 2000; Krätzer *et al.*, 2001). Um zu zeigen, dass E1B-55K auch in Nagerzellen über diesen Exportweg transportiert wird, wurden primäre Nierenepithelzellen aus neugeborenen Ratten (BRK, *baby rat kidney*) mit Expressionsplasmiden transfiziert, die für das Wildtypprotein (pE1B-55K) oder die E1B-NES-Mutante (pE1B-NES) kodieren (Abb. 6 A). Anschließend wurde die *Steady state*-Lokalisation der viralen Proteine durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen bestimmt (Abb. 6 B a und b).

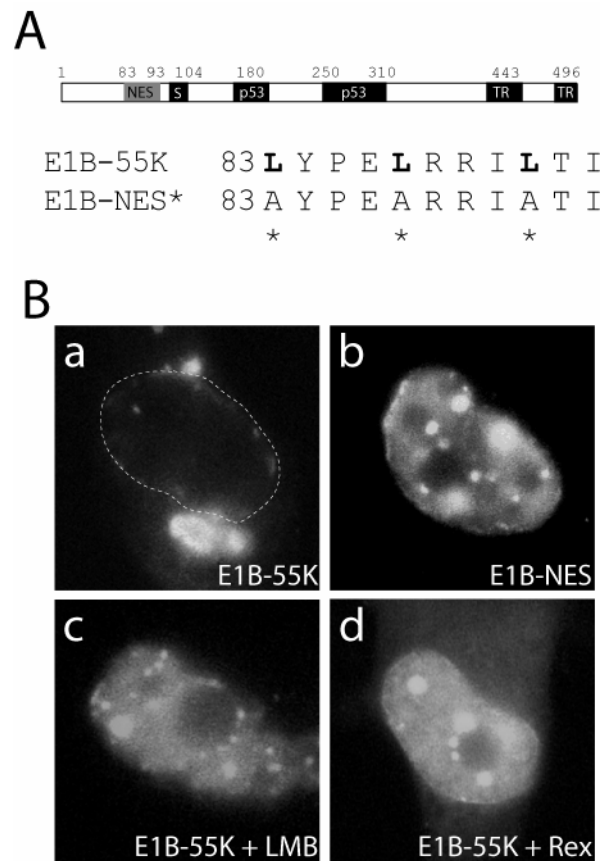


Abb. 6 Ad5 E1B-55K *shuttelt* in primären BRK-Zellen

(A) Dargestellt sind die Domänen von E1B-55K, die für die SUMO1-Modifikation (S), die p53-Bindung (p53), die Repression der Transkription (TR) und die Transformation verantwortlich sind. Sie sind als schwarze Boxen dargestellt. Die Lokalisation des NES ist als graue Box dargestellt. Die angegebenen Zahlen entsprechen den Aminosäurepositionen im Protein. Markiert sind die Aminosäurepositionen des NES (Aminosäurereste 83-93) im Wildtypprotein (E1B-55K) und der Mutante (E1B-NES*) mit Alaninsubstitutionen an den Positionen 83, 87 und 91. Die Leucinreste, die für den Export essentiell sind, sind fett dargestellt (Krätzer *et al.*, 2000). (B) Subkonfluente BRK1-Zellen wurden mit E1B-55K- (a, c und d) oder E1B-NES-Expressionskonstrukten transfiziert und anschließend entweder 3 h vor der Methanolfixierung mit 10 nM LMB behandelt (c) oder mit einem Expressionsplasmid für HTLV-1 Rex-p21 kotransfiziert (d). Die Zellen wurden *in situ* mit dem Anti-E1B-Antikörper 2A6 inkubiert und anschließend mit dem anti-Maus-FITC-gekoppelten Sekundärantikörper die Lokalisation von E1B-55K (a-d) detektiert. Vergrößerung x 7600.

Wie erwartet, zeigte das Wildtypprotein die für Ad5 E1B-55K charakteristische zytoplasmatische Lokalisation in großen perinukleären Aggregaten (Abb. 6 B a; Endter *et al.*, 2005). Im Unterschied dazu war die E1B-NES-Mutante fast ausschließlich in nukleären Komplexen nachzuweisen (Abb. 6 B b; Endter *et al.*, 2005). Eine Akkumulation des Wildtypproteins im Zellkern wurde auch durch die Zugabe von Leptomycin B (Abb. 6 B c; Endter *et al.*, 2005) oder durch die

Koexpression von HTLV-1 Rex-p21 beobachtet (Abb. 6 B d; Endter *et al.*, 2005), die bekanntermaßen über irreversible Modifikation von CRM1 (Leptomycin B, LMB) oder durch kompetitive Bindung (Rex-p21) an den Exportrezeptor CRM1-abhängige Transportwege blockieren. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass E1B-55K auch in primären BRK-Zellen über das Leucin-reiche NES mit Hilfe des Exportrezeptors CRM1 zwischen dem Zellkern und Zytoplasma pendelt.

5.1.2 Die Inhibition der Kernexportfunktion steigert das transformierende Potenzial von E1B-55K in primären BRK-Zellen und die Repression der p53-Transaktivierung

Wie bereits beschrieben, weisen alle bisherigen Beobachtungen darauf hin, dass das transformierende Potenzial des Ad5 E1B-55K-Proteins direkt mit der Repression der transkriptionsaktivierenden Eigenschaften von p53 gekoppelt ist (Yew *et al.*, 1990; Teodoro *et al.*, 1994; Endter *et al.*, 2001). Es wird diskutiert, dass die Modulation der tumorsupprimierenden Eigenschaften von p53 in mehreren, sich synergistisch verstärkenden Schritten erfolgt, die sowohl die direkte Interaktion mit Promotor-gebundenem p53 als auch die CRM1-abhängige Sequestration in inaktive zytoplasmatische Aggregate umfassen. Zur Aufklärung dieser Arbeitshypothese wurden klassische Transformationsversuche (*Focus-Assays*) auf der Basis primärer BRK-Zellen (4.2.4) und transiente Reporterversuche in humanen p53-negativen H1299-Zellen durchgeführt (4.5). Für die Transformationsversuche wurden dabei 4 µg pE1A und unterschiedliche Mengen pE1B-55K und pE1B-NES in primäre BRK-Zellen mittels der Kalziumphosphat-Methode transfiziert (Abb. 7). Als Kontrolle wurde pE1B-K104R verwendet, das für die transformationsdefekte Mutante E1B-K104R kodiert und einen Aminosäureaustausch (K104R) im E1B-SKM enthält (Endter *et al.*, 2001).

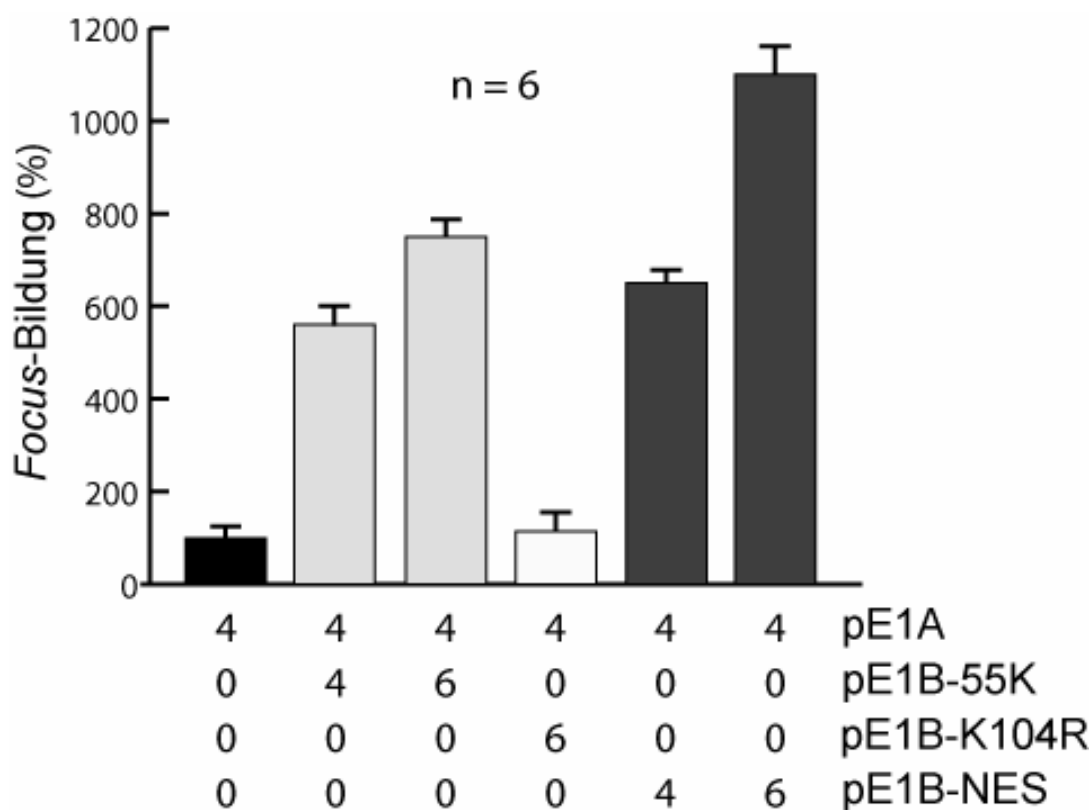


Abb. 7 Focus-Bildung durch E1B-55K und E1B-NES in Kooperation mit E1A

Primäre BRK-Zellen wurden mit den angegebenen Mengen Plasmid (in μg DNA auf 3×10^6 Zellen) nach der Kalziumphosphat-Methode (4.2.3.1) transfiziert und wie unter 4.2.4 beschrieben weiterkultiviert. Die Transformationseffizienz ist dargestellt als % *Focus*-Bildung, wobei die Aktivität von pE1A alleine auf 100% normiert wurde. Dargestellt ist das Ergebnis aus sechs unabhängigen Versuchen.

Die Kotransfektion von pE1A mit steigenden Mengen pE1B-55K führte im Vergleich zu pE1A alleine zu einer fünf- bis siebenfachen Erhöhung der *Focus*-Anzahl (Abb. 7; Endter *et al.*, 2005). Im Unterschied dazu war die E1B-K104R-Mutante nicht mehr in der Lage, primäre BRK-Zellen in Kooperation mit E1A zu transformieren (Abb. 7; Endter *et al.*, 2001; Endter *et al.*, 2005). Überraschenderweise resultierte die Koexpression der E1B-NES-Mutante nicht in einer Reduktion der *Focus*-Bildung. Stattdessen war ein dosisabhängiger Anstieg der *Foci* um 20-40% relativ zu E1B-55K-Wildtyp zu beobachten (Abb. 7). Ein deckungsgleiches Ergebnis ergaben die Reportergergenversuche (Abb. 8 A).

Dazu wurden p53-negative H1299-Zellen mit dem Reporterplasmid pRE-LUC in Kombination mit pC53-SN3 und pE1B-55K, pE1B-NES oder pE1B-K104R als Kontrolle kotransfiziert.

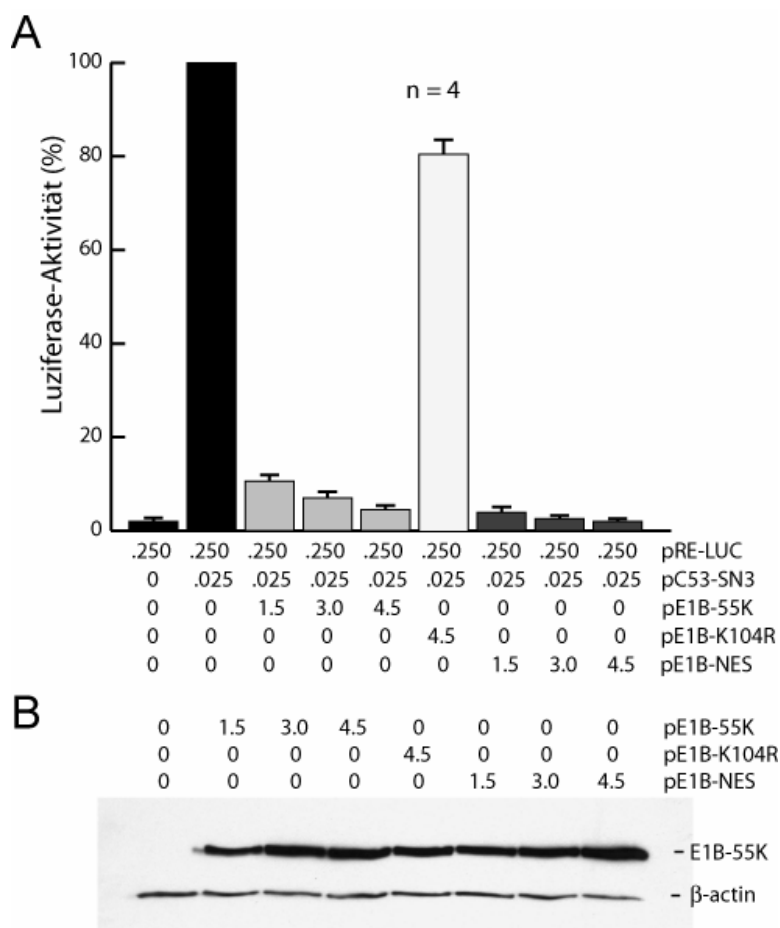


Abb. 8 Effekte von E1B-55K und E1B-NES auf die p53-abhängige Transaktivierung

(A) $2,5 \times 10^5$ H1299-Zellen wurden mit den angegebenen Mengen an Reporter- und/oder Effektorplasmiden (μg DNA) nach der Kalziumphosphat-Methode (4.2.3.1) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit Lyse-Puffer aufgeschossen und die Aktivität der einzelnen Konstrukte mit dem *Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System* (Promega) bestimmt. Die Aktivität der *Firefly*-Luciferase in Anwesenheit von Wildtyp p53 (pC53-SN3) wurde quantitativ bestimmt und als Referenzwert auf 100% normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus vier unabhängigen Versuchen. (B) Expressionslevel von E1B-55K-Wildtyp, E1B-NES und E1B-K104R. Die Proteinproben aus dem Luciferase-Assay wurden über ein 10%iges-SDS-Gel aufgetrennt, wobei die aufgetragene Menge mittels der *Renilla*-Luciferase-Aktivität angeglichen wurde. Die Proteine wurden durch *Western Blot* auf Nitrozellulose übertragen und die Gleichgewichtsmengen der E1B-Proteine mit Hilfe des E1B-Antikörpers 2A6. Der Nachweis des β -actin-Proteins erfolgte mit dem Antikörper AC-15 und diente als Ladekontrolle.

Wie erwartet reprimierte E1B-55K die p53-stimulierte Transkription des *Firefly*-Luziferaseplasmids pRE-LUC dosisabhängig auf eine Restaktivität von 10% bis 5% (Abb. 8 A; Endter *et al.*, 2005) während E1B-NES die Inhibition der p53-Transaktivierung noch weiter verstärkte (5% bis 1%). In Übereinstimmung mit früheren Daten hatte die Mutante E1B-K104R nur einen geringen Einfluss auf die p53-regulierte Promotoraktivität (Endter *et al.*, 2001). Die beobachteten Unterschiede waren dabei nicht auf verschiedene Gleichgewichtsmengen der E1B-Proteine zurückzuführen, da *Western Blot*-Analysen mit Gesamtzellextrakten aus den transfizierten H1299-Zellen annähernd gleiche Signalstärken mit dem E1B-spezifischen Antikörper 2A6 zeigten (Abb. 8 B; Endter *et al.*, 2005). Die Übereinstimmung der Ergebnisse aus den Transformations- und Reporterexperimenten zeigt, dass der NES-abhängige nukleäre Export von E1B-55K über CRM1 weder für die kooperative *Focus*-Bildung noch für die effiziente Repression der p53-Transaktivierung notwendig ist.

5.1.3 Die zytoplasmatische Sequestration von p53 ist unabhängig von der Kernexportfunktion des E1B-55K-Proteins

Auf der Grundlage dieser hoch interessanten Ergebnisse wurde im nächsten Schritt die subzelluläre Verteilung von E1B-55K und p53 in stabil transformierten BRK-Zellen untersucht. Unter anderem sollte dadurch die Frage beantwortet werden, ob die Kernexportfunktion von E1B-55K für die Umverteilung von kernständigem p53 und die Ausbildung der periunkleären Proteinaggregate im Zytoplasma verantwortlich ist. Ausgehend von den Transformationsversuchen mit pE1A und pE1B-NES wurden nach G418-Selektion zwei stabile Zelllinien (AB18 und AB115) etabliert und die Lokalisation von E1B-NES und p53 im Vergleich zu E1B-55K (AB120) durch indirekte Immunfluoreszenzanalyse bestimmt (Abb. 9; Endter *et al.*, 2005).

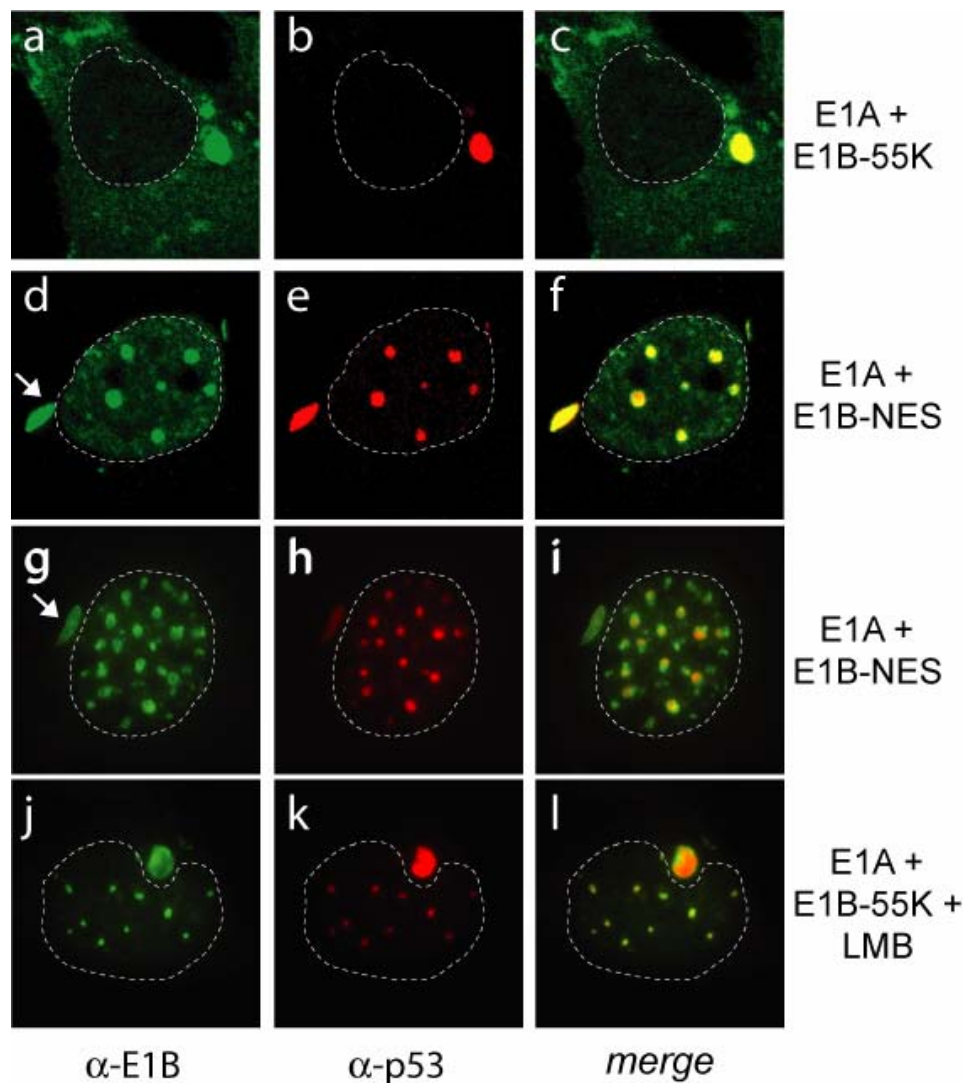


Abb. 9 *Steady state*-Lokalisation von E1B-55K und p53 in transformierten BRK-Zellen
 AB120- (E1B-55K; a-c), AB18- (E1B-NES; d-f), AB115-Zellen (E1B-NES; g-i) und AB120-Zellen (E1B-55K) die vor der Fixierung 3 h mit 10 nM LMB behandelt wurden, wurden *in situ* mit anti-E1B-Antikörper 2A6 aus Maus und anti-p53-Antikörper FL393 aus Kaninchen doppelmarkiert. Diese wurden wiederum mit den anti-Maus-FITC- oder anti-Kaninchen-Texasrot-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert. Die Überlagerungen (*merge*) der Lokalisationen von E1B (grün, a, d, g, j) und p53 (rot, b, e, h, k) sind in c, f, i und l dargestellt. Die Pfeile in d und g weisen auf die perinukleären Proteinkomplexe hin. Die gestrichelten Linien in jedem Bild geben jeweils die Lage und Größe des Zellkerns an. Vergrößerung x 7600.

Im Vergleich zu E1B-55K-Wildtyp-exprimierenden Zellen (AB120; Endter *et al.*, 2001) wies E1B-NES ein deutlich unterschiedliches Verteilungsmuster auf. Während der Großteil des E1B-55K-Proteins in AB120-Zellen zytoplasmatisch lokalisiert war und dort zusammen mit p53 im perinukleären Proteinkomplex akkumulierte (Abb. 9, a-

c), zeigte das virale Protein in den E1B-NES-Zelllinien eine diffuse nukleäre Verteilung und aggregierte dort zusammen mit p53 in mehreren dichten Proteinkomplexen (AB18-Zellen: Abb. 9 d-f; AB115-Zellen Abb. 9, g-i). Zusätzlich konnte in den meisten Zellen (>90%) E1B-55K und p53 noch immer in einem zytoplasmatischen Proteinkomplex detektiert werden, der in diesen Fällen aber leicht elongiert und nicht mehr ganz so nahe am Kern liegend erschien (Abb. 9, d+g Pfeile).

Die unterschiedliche Verteilung des Wildtyp- und NES-Proteins zeigt deutlich, dass E1B-55K auch in stabil E1A/E1B-transformierten BRK-Zellen über den CRM1-abhängigen Exportweg pendelt. Andererseits lässt der Nachweis des zytoplasmatischen E1B/p53-Proteinkomplexes vermuten, dass die Ausbildung dieser Aggregate unabhängig vom CRM1-vermittelten Exportweg erfolgt. Dies wird auch durch die Beobachtung unterstrichen, dass AB120-Zellen, die mit LMB behandelt wurden, eine ähnliche subzelluläre Verteilung von E1B-55K wie die E1B-NES-Zellen aufwiesen (Abb. 9, j-l).

5.1.4 Das E1B-NES-Protein induziert die Umverteilung von nukleären PML-NBs in stabil transformierten BRK-Zellen

Frühere Untersuchungen zur Lokalisation des E1B-55K-Proteins in Ad-infizierten Zellen haben ergeben, dass Ad5 E1B-55K in der frühen Phase einer lytischen Infektion mit punktförmigen subnukleären Strukturen kolokalisiert, die als PODs (PML *oncogenic domains*) oder PML-NBs (PML *nuclear bodies*) bezeichnet werden (Doucas *et al.*, 1996). Aufgrund dieser Beobachtung lag es nahe zu überprüfen, ob die in den AB18- und AB115-Zellen beobachteten E1B-NES/p53-positiven Kernstrukturen den PML-NBs entsprechen. Dazu wurden Doppelmarkierungsversuche mit Antikörpern gegen E1B-55K, p53 oder PML, dem Markerprotein der PML-NBs, durchgeführt. Die subzelluläre Verteilung der Proteine wurde anschließend durch indirekte Immunfluoreszenz bestimmt (Abb. 10; Endter *et al.*, 2005).

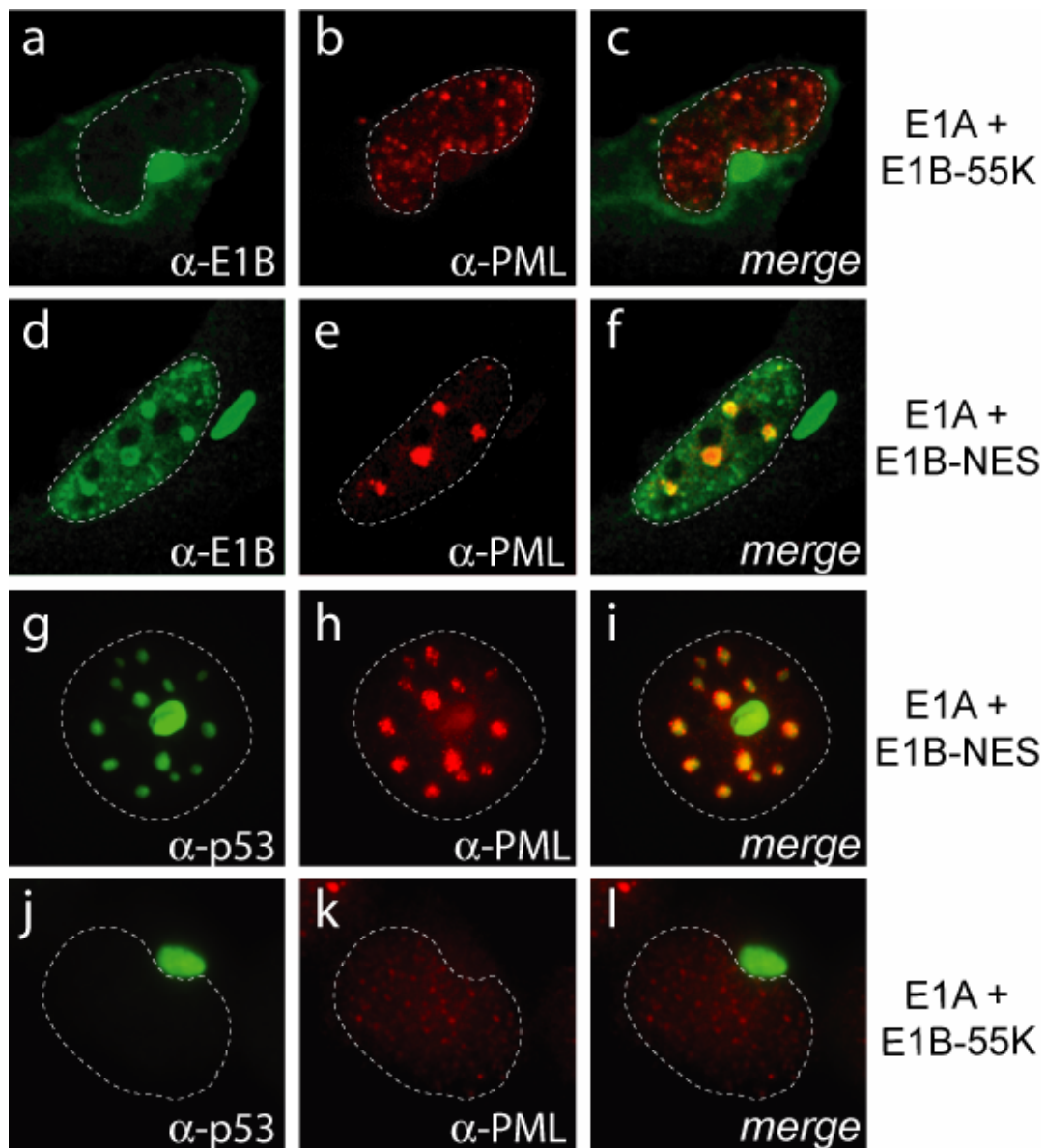


Abb. 10 Kolokalisation von E1B-55K, E1B-NES und p53 mit PML in transformierten BRK-Zellen
 AB120- (E1B-55K; a-c) und AB115-Zellen (E1B-NES; d-f) wurden *in situ* mit anti-E1B-55K-Antikörper 7C11 aus Ratte und anti-PML-Antikörper 5E10 aus Maus markiert. Diese wurden wiederum mit den anti-Ratte-FITC- oder anti-Maus-Texasrot-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert. Die Überlagerungen (*merge*) der Lokalisationen von E1B (grün, a, g) und PML (rot, b, h) sind in c und i dargestellt. Weiterhin wurden AB120- (j-l) und AB115-Zellen (g-i) *in situ* mit dem anti-p53-Antikörper FL393 aus Kaninchen und dem anti-PML-Antikörper 5E10 aus Maus doppelmarkiert und wiederum mit den anti-Kaninchen-FITC- oder anti-Maus-Texasrot-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert. Überlagerungen (*merge*) der Lokalisationen von p53 (grün; g, j) und PML (rot; h, k) sind in i und l dargestellt. Die gestrichelten Linien in den Bildern geben jeweils die Lage und Größe des Zellkerns an. Vergrößerung x 7600.

Tatsächlich konnte in AB115-Zellen eine eindeutige Kolokalisation von PML mit den E1B-NES/p53-haltigen nukleären Proteinkomplexen nachgewiesen werden (Abb. 10,

f+i). Von Interesse ist dabei die Tatsache, dass das E1B-NES-Polypeptid neben der Relokalisation von p53 auch die Umverteilung von PML induzierte, da die charakteristische punktförmige Verteilung des zellulären Proteins im Vergleich zu AB120-Zellen (Abb. 10, b+c) nicht mehr gleichmäßig über den gesamten Zellkern verteilt war, sondern zusammen mit E1B-NES in wenigen nukleären Aggregaten lokalisierte. Im Unterschied zu E1B und p53 besitzen diese PML-Strukturen jedoch keine einheitlich globuläre Struktur (Abb. 11, a+d), sondern setzen sich aus mehreren kleineren Aggregaten zusammen (Abb. 11, b+e), die an der Peripherie der E1B-positiven Strukturen akkumulieren (Abb. 11, c+f).

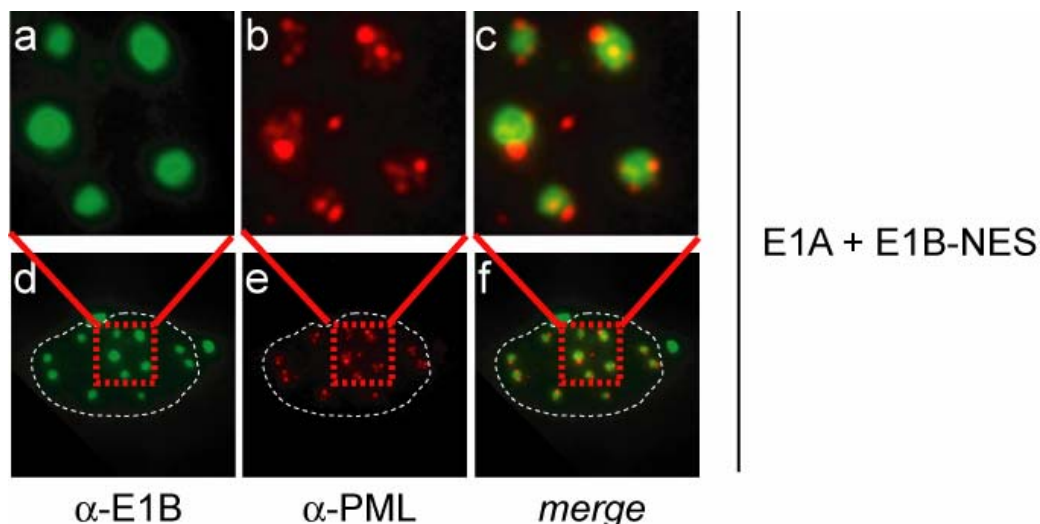


Abb. 11 Detailansicht der E1B-NES/PML-Strukturen in AB115-Zellen

AB115-Zellen die E1B-NES exprimieren, wurden *in situ* mit anti-E1B-55K-Antikörper 7C11 aus Ratte und anti-PML-Antikörper 5E10 aus Maus markiert. Diese wurden wiederum mit den anti-Ratte-FITC- oder anti-Maus-Texasrot-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert. Die Überlagerungen (*merge*) der Lokalisationen von E1B (grün, a, d) und PML (rot, b, e) sind in c und f dargestellt. Vergrößerung der Bilder a-c $\times 7600$. In den Bildern a-c wurden die rot-umrandeten Bereiche der Bilder d-f mittels Adobe-Photoshop CS herausvergrößert. Die weiß gestrichelten Linien in den Bildern geben jeweils die Lage und Größe des Zellkerns an.

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass das E1B-NES-Protein eine komplette Umverteilung vollständiger PML-NBs im Zellkern induziert. Um dies zu überprüfen wurde deshalb in einem weiteren Ansatz die subzelluläre Lokalisation des PML-NB-assoziierten Proteins daxx in AB120- und AB115-Zellen untersucht. Diese Analysen ergaben, dass daxx, analog zu PML, in AB115-Zellen (Abb. 12, g-i) an die Peripherie

der E1B-positiven Aggregate sequestriert wird (Abb. 12, i). Eine ähnliche Verteilung des daxx-Proteins wurde auch in AB120-Zellen beobachtet, die mit dem CRM1-Inhibitor LMB behandelt wurden (Abb. 12, d-f).

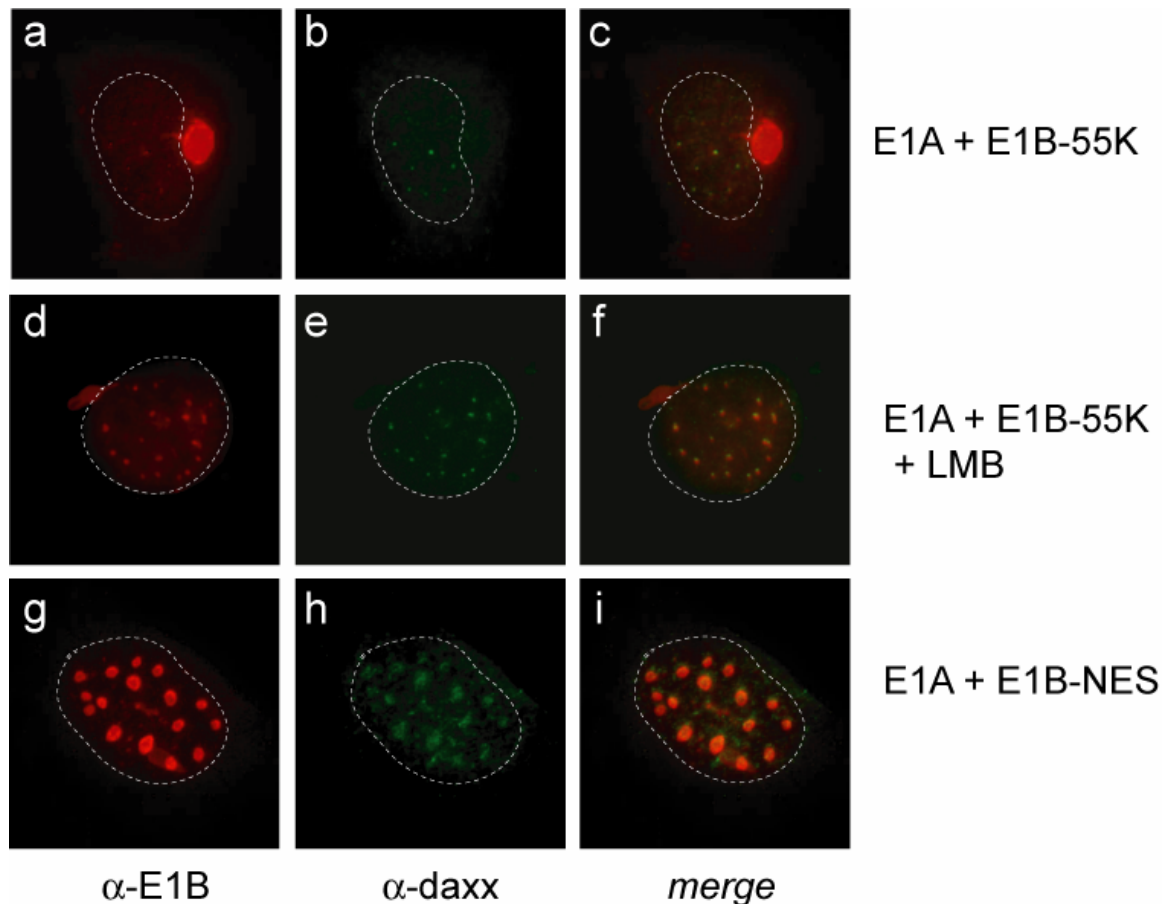


Abb. 12 *Steady state*-Lokalisation von E1B-55K und daxx in E1B-55K-Wildtyp- und E1B-NES-transformierten BRK-Zellen

AB120-Zellen (E1B-55K; a-f) wurden entweder 3 h vor der Fixierung mit 10 nM LMB behandelt (d-f) oder nicht behandelt (a-c) und gleichzeitig mit AB115-Zellen (E1B-NES; g-i) *in situ* mit dem anti-E1B-Antikörper 2A6 aus Maus und dem anti-daxx-Antikörper aus Kaninchen doppelmarkiert und anschließend mit den anti-Kaninchen-FITC- oder anti-Maus-Texasrot-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert. Überlagerungen (*merge*) der Lokalisationen von E1B (rot; a, d, g) und daxx (grün; b, e, h) sind in c, f und i dargestellt. Die gestrichelten Linien in den Bildern geben jeweils die Lage und Größe des Zellkerns an. Vergrößerung x 7600.

Im Ganzen lassen die Ergebnisse dieser Untersuchungen darauf schließen, dass die Inhibition des CRM1-abhängigen Kernexports von E1B-55K durch LMB oder Aminosäureaustausche im E1B-NES die nukleäre Akkumulation des viralen Proteins zusammen mit p53 induziert. Weiterhin weist die Relokalisation von PML und daxx, in subnukleäre Aggregate darauf hin, dass zusätzlich eine Sequestration von

kompletten PML-NB-Strukturen stattfindet. Interessanterweise korrelierten diese Beobachtungen direkt mit der Steigerung des transformierenden Potenzials von E1B-55K in Kooperation mit E1A (Abb. 7) und der Erhöhung der Inhibition der p53-vermittelten Transaktivierung durch E1B-NES (Abb. 8).

5.1.5 Das E1B-NES-Protein steigert die Tumorigenität transformierter BRK-Zellen in immundefizienten Nacktmäusen

Neben ihrer zentralen Rolle bei den initialen Vorgängen der Zelltransformation besitzen die großen E1B-Proteine der Subgruppe A und C Adenoviren weitere Funktionen, die den tumorigenen Phänotyp E1A/E1B-transformierter Zellen beeinflussen (Bernards *et al.*, 1982; Sawada *et al.*, 1988). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Ad5 E1A/E1B-transformierte Rattenzellen mit geringen Mengen E1B-55K, schneller Tumoren in Nacktmäusen induzieren als Zellen mit hohen Expressionsraten des viralen Proteins (van den Heuvel *et al.*, 1990). Die Reduktion der Tumorigenität korreliert dabei mit der Depletion von p53 aus dem Kern (van den Heuvel *et al.*, 1990). Deshalb wird angenommen, dass die Ad5 E1B-abhängige zytoplasmatische Sequestration von p53 die Fähigkeit der Zellen *in vivo* neoplastisch zu wachsen vermindert. Aufgrund der Beobachtung, dass die E1B-NES-haltigen Zelllinien einen hohen Anteil an nukleärem p53 enthalten, wurden die tumorigenen Eigenschaften von AB18- und AB115-Zellen im Vergleich zu AB120-, AB19- und ABS1-Zellen in thymusdefizienten Nacktmäusen NMRI (*nu/nu*) getestet (Tab. 3; Endter *et al.*, 2005). AB19-Zellen enthalten die sumoylierungsdefekte E1B-Mutante K104R (Endter *et al.*, 2001) während ABS1-Zellen zusätzlich zu E1A und E1B-55K das Ad5 E4orf6-Protein exprimieren und schnell wachsende, hochgradig-maligne Tumore in Nacktmäusen induzieren (Rubenwolf *et al.*, 1997).

Tab. 3 Tumorigenität verschiedener transformierter Zelllinien in Nacktmäusen

Zelllinie	Virale Proteine	Nr. der Tiere mit Tumor/Gesamtzahl der Tiere	Latenzzeit (Tage)	Mittlere Tumogröße (mm ²) ± <i>s.e.m.</i>
AB120	E1A/E1B-55K	1/6	40	4 ± 0
AB19	E1A/E1B-K104R	0/6	-	0 ± 0
AB18	E1A/E1B-NES	6/6	12	71 ± 44
AB115	E1A/E1B-NES	6/6	12	206 ± 68
ABS1	E1A/E1B-55K/ E4orf6	6/6	12	131 ± 14

Während der Beobachtungszeit von 67 Tagen entwickelten Tiere, die AB18-, AB115- oder ABS1-Zellen injiziert bekommen hatten, auffällige Tumoren. Bei allen drei Zelllinien setzte das Tumorwachstum schon 12 Tage nach Injektion ein. Im Gegensatz dazu, konnte für die Zelllinie AB19 kein Tumorwachstum beobachtet werden. Übereinstimmend mit früheren Arbeiten wuchsen die ABS1-induzierten Tumoren sehr schnell und erreichten Größen von 130 mm² schon 33 Tage nach Injektion. Die Tiere wurden deshalb aus ethischen Gründen getötet. Zum gleichen Zeitpunkt wurden für die AB18- und AB115-Zellen signifikant kleinere Tumore (12 mm²) ermittelt, obwohl am Ende der 67-tägigen Beobachtungszeit die mittleren Tumogrößen bei 71 bzw. 206 mm² lagen. Von den Tieren, die AB120-Zellen erhalten hatten entwickelte nur eine Nacktmaus einen Tumor mit einer Latenzzeit von 40 Tagen. Am Versuchsende wurden Zellen aus den Tumoren isoliert, die Expression von E1A, E1B oder p53 mittels indirekter Immunofluoreszenz sowie *Western Blot* analysiert und mit den parentalen Zelllinien AB120 und AB115 verglichen (Abb. 13; Endter *et al.*, 2005). Wie in der Zelllinie AB115 zeigte das E1B-NES-Protein in den korrespondierenden Tumorzellen eine nukleäre punktförmige Verteilung (Abb. 13 A, a-c). Auch bei den AB120-abgeleiteten Tumorzellen gab es keinen Unterschied zu der parentalen Zelllinie. Der Großteil des E1B-Proteins lokalisierte zusammen mit p53 in großen zytoplasmatischen, perinukleären Aggregaten (Abb. 13 A, d-f). Auch in den

Western Blot-Analysen konnte kein deutlicher Unterschied in den Proteinmengen von E1B, E1A und p53 zwischen den Tumorzellen (Abb. 13 B, Spur 2 und 3) und den parental Zellen (Abb. 13 B, Spur 5 und 6) festgestellt werden.

Diese Beobachtungen zeigen, dass E1B-55K ohne funktionelles NES die Tumorigenität E1A/E1B-transformierter BRK-Zellen dramatisch steigert und weisen darauf hin, dass dieser Effekt mit der beobachteten Umverteilung von p53 und kompletten PML-NB-Strukturen in subnukleäre Aggregate in Verbindung steht.

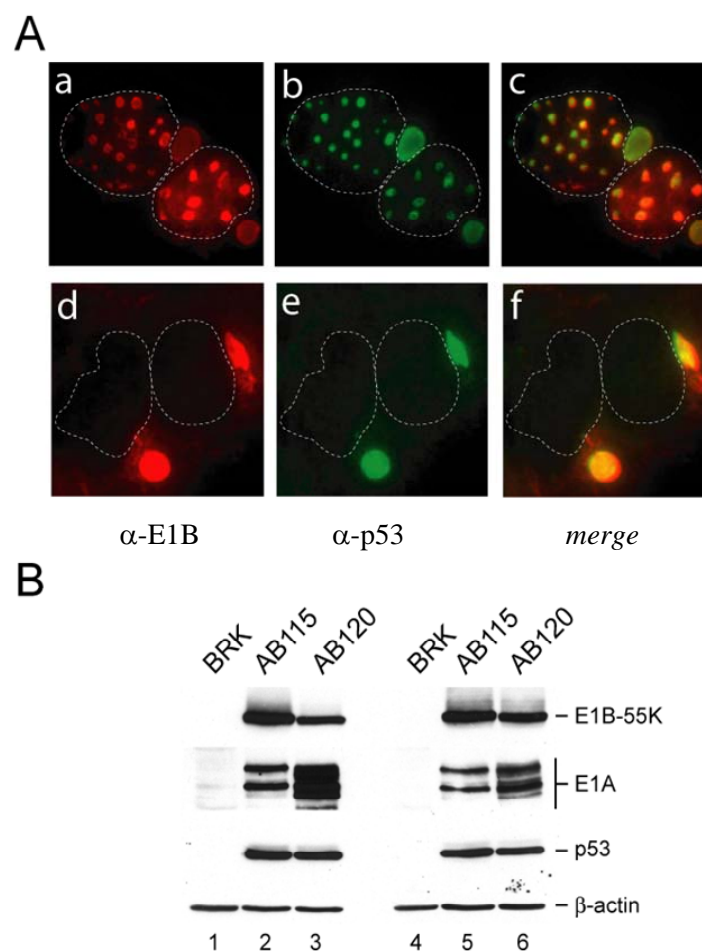


Abb. 13 *Steady state*-Lokalisation und Expression von E1B-55K-Wildtyp, E1B-NES und p53 in AB115- und AB120-abgeleiteten Tumoren

(A) Aus Tumoren isolierte AB115-Zellen (a-c) und E1B-Wildtyp-exprimierende AB120-Zellen (d-f) wurden *in situ* mit anti-E1B-Antikörper 2A6 aus Maus und anti-p53-Antikörper FL393 aus Kaninchen doppelmarkiert und anschließend mit den anti-Kaninchen-FITC- oder anti-Maus-Texasrotgekoppelten Sekundärantikörpern detektiert. Überlagerungen (*merge*) der Lokalisationen von E1B (rot; a, d) und p53 (grün; b, e) sind in c und f dargestellt. Die gestrichelten Linien in den Bildern geben jeweils die Lage und Größe des Zellkerns an. Vergrößerung $\times 7600$. (B) Proteinmengen von E1B-55K-Wildtyp, E1B-NES, E1A und p53 in primären BRK-Zellen (Spuren 1 und 4), AB115- und AB120-abgeleiteten Tumorzellen (Spuren 2 und 3) und den parental Zellen AB115 und AB120 (Spuren 5

und 6). Es wurden jeweils 50 µg Gesamtzelleextrakt über 10%ige SDS-Gele aufgetrennt, durch *Western Blot* auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen E1B-55K (2A6), E1A (M73), p53 (FL393) oder β -actin (AC-15) als Ladekontrolle inkubiert.

5.2 Identifizierung eines p53-unabhängigen Mechanismus im Ad5 E1B-55K-vermittelten Transformationsprozess

5.2.1 Funktionelle Domänen in E1B-55K

Schon seit einigen Jahren wird diskutiert, dass die großen E1B-Proteine der Subgruppe A und C Adenoviren (Ad12 oder Ad2/5) neben der Inhibition p53-regulierter Vorgänge weitere Aktivitäten besitzen, die in Kooperation mit E1A zur vollständigen Transformation beitragen (Endter und Dobner, 2004). Die experimentellen Grundlagen für diese Annahme stammen primär aus Analysen zur Rolle des Ad5 E1B-Proteins in der Regulation des produktiven (lytischen) Infektionszyklus in permissiven Wirtszellen und den in dieser Arbeit bisher erzielten Ergebnissen. Im Ganzen weisen diese Befunde darauf hin, dass die lytischen Funktionen von Ad5 E1B-55K direkt mit seinen onkogenen Eigenschaften gekoppelt sind und über ein komplexes Netzwerk unterschiedlicher Protein-Proteinwechselwirkungen mit viralen und zellulären Faktoren vermittelt werden. An erster Stelle steht dabei die Modulation von PML, daxx und anderen PML-NB-assoziierten Proteinen (diese Arbeit) sowie der E1B-55K/E4orf6-vermittelte proteolytische Abbau von p53 über einen neuen E3-Ubiquitin-Ligasekomplex der Elongin B/C-Familie (Harada *et al.*, 2002; Querido *et al.*, 2001b; Blanchette *et al.*, 2004).

Interessanterweise, wurde kürzlich mit Mre11 ein weiteres zelluläres Protein identifiziert, das über die Bindung an E1B-55K an Proteasomen abgebaut wird (Blanchette *et al.*, 2004). Das onkogene Potenzial von E1B-55K könnte somit auch post-translationale Funktionen beinhalten und mit der Modulation von Schlüsselproteinen der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in Verbindung stehen. In diesem Zusammenhang konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden

dass die Aminosäuresequenz des E1B-55K-Polypeptids zwei Sequenzmotive besitzt, die signifikante Übereinstimmungen mit sog. BC-Boxen bzw. RING-Fingerdomänen aufweisen (Abb. 14). Das BC-Boxmotiv vermittelt die Bindung von Elongin B und C und ist in einer Reihe von Proteinen, einschließlich dem *von-Hippel-Lindau*-Tumorsuppressorprotein (VHL) enthalten (zur Übersicht: Kamura *et al.*, 1998; Kamura *et al.*, 2001; Kamura *et al.*, 2004). RING-Fingermotive dagegen repräsentieren Zink-bindende Domänen, die durch eine definierte Anordnung von Cystein- und Histidinresten gekennzeichnet sind (zur Übersicht: Matthews und Sunde, 2002). Klassische und davon abweichende, atypische RING-Fingerdomänen kommen unter anderem in Komponenten von E3-Ubiquitin-Ligasekomplexen und verschiedenen E3-SUMO-Ligasen vor (Joazeiro und Weissman, 2000; Pichler *et al.*, 2002). Da sowohl die BC-Box als auch die RING-Fingerdomäne in den großen E1B-Proteinen humaner Serotypen konserviert sind, könnten beide Proteininteraktionsmodule an den post-translationalen und transformierenden Funktionen von E1B-55K beteiligt sein.

In Übereinstimmung dazu weisen erste, in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Mutationsanalysen darauf hin, dass definierte Aminosäureaustausche in beiden Motiven die transformationsrelevanten Eigenschaften von E1B-55K beeinflussen (Zeller, 2004). Von besonderem Interesse ist hierbei die Beobachtung, dass die RING-Fingerdomäne wahrscheinlich ein kritisches Strukturelement des viralen Proteins darstellt und möglicherweise über einen noch unbekanntem Mechanismus zur vollständigen Zelltransformation beiträgt. Vor dem Hintergrund dieser Beobachtungen wurde diese Hypothese im zweiten Teil der Arbeit mit ausgewählten E1B-Mutanten (Abb. 14) überprüft und die Rolle der BC-Box- und RING-Fingerdomäne im E1B-vermittelten Transformationsprozess auf molekularer Ebene analysiert.

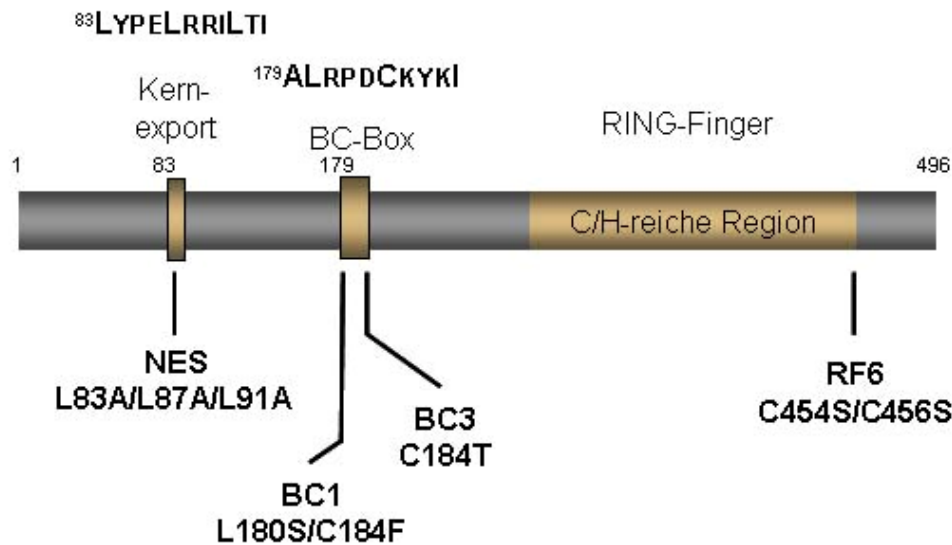


Abb. 14 Übersicht der untersuchten Ad5 E1B-55K-Mutanten

Die Konsensussequenzen der NES und der BC-Box sind entsprechend ihrer Lage im E1B-55K-Protein dargestellt (oben). Die Aminosäureaustausche in den Motiven sind mit den jeweiligen Kurznamen der Mutanten NES, BC1, BC3 und RF6 abgebildet. Nummern kennzeichnen jeweils die Position der ersten Aminosäure in den Motiven.

5.2.2 Mutationen in der BC-Box und RING-Fingerdomäne verringern das transformierende Potenzial von Ad5 E1B-55K

Die Rolle der BC-Box und RING-Fingerdomäne in der E1B-vermittelten Transformation wurde durch klassische Transformationsversuche überprüft (Abb. 15). Dazu wurde pE1A zusammen mit dem Expressionsplasmid pE1B-55K, pE1B-BC1, pE1B-BC3 oder pE1B-RF6 in primäre BRK-Zellen transfiziert. In den Kontrollansätzen wurde pE1A und pE1A in Kombination mit pE1B-NES verwendet. Nach vier Wochen wurden die transformierten Zellklone (*Foci*) mit Kristallviolett angefärbt und ausgezählt (Abb. 15). Parallel dazu wurden die *Foci* aus jeweils einer Schale nach G418-Selektion als stabile Zelllinien etabliert (4.2.5).

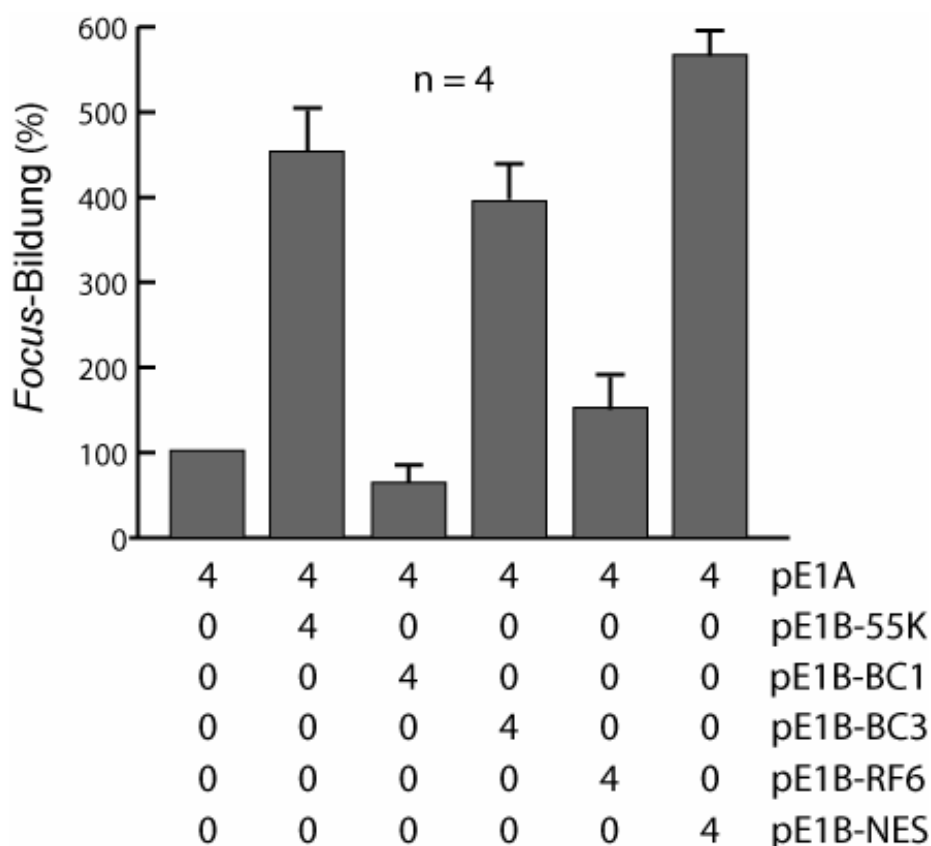


Abb. 15 Focus-Bildung durch E1B-55K, E1B-BC1, E1B-BC3 oder E1B-RF6 in Kooperation mit E1A
 Primäre BRK-Zellen wurden mit den angegebenen Mengen Plasmid (in μg DNA auf 3×10^6 Zellen) nach der Kalziumphosphat-Methode (4.2.3.1) transfiziert und wie unter 4.2.4 beschrieben weiterkultiviert. Die Transformationseffizienz ist dargestellt als % *Focus*-Bildung relativ zur Aktivität von pE1A, die auf 100% normiert wurde. Dargestellt sind die Ergebnisse aus vier unabhängigen Versuchen.

Wie erwartet führte die Koexpression von E1A und E1B-NES zu einer Steigerung der Transformationsrate im Vergleich zum Wildtypprotein während bei E1B-BC3 ein leichter Rückgang (70% Wildtypaktivität) in der Anzahl der *Foci* beobachtet wurde. Dagegen ergab die Kotransfektionen von pE1A mit pE1B-BC1 oder pE1B-RF6 (30% Wildtypaktivität) reproduzierbar eine dramatische Abnahme der *Focus*-Zahl, die bei bei pE1B-BC1 (15% Wildtypaktivität) sogar noch unter dem Wert von pE1A lag. Die Aminosäureaustausche in BC1 (L180S/C184F) und RF6 (C454S/C456S) haben somit einen stark negativen Einfluss auf die kooperativen Eigenschaften von E1B-55K während sich die C184T-Substitution in E1B-BC3 scheinbar neutral verhält.

5.2.3 Mutationen in der RING-Fingerdomäne haben keinen Einfluss auf die transkriptionsreprimierenden Funktionen des E1B-55K-Proteins

5.2.3.1 Reportergergenversuche mit p53-abhängigen Promotoren

Im nächsten Schritt wurden die E1B-Mutanten hinsichtlich ihrer transkriptionsreprimierenden Funktionen mit Hilfe transienter Reportergergenversuche analysiert. Als Reporter wurden die Plasmide pRE-LUC und pcyclinG-LUC verwendet, die jeweils die *Firefly*-Luziferase (LUC) unter der Kontrolle eines p53-abhängigen Promotors (pRE oder CyclinG) exprimieren. pRE-LUC entspricht dabei einem artifiziellen Promotor mit fünf p53-Bindungsstellen, während pcyclinG-LUC den Promotorbereich des zellulären CyclinG-Gens enthält.

Zur Durchführung der Versuche mit pRE-LUC wurden, wie unter 4.5 beschrieben, p53-negative H1299-Zellen mit dem p53-Expressionsplasmid pC53-SN3 und den in Abb. 16 angegebenen E1B-Expressionsplasmiden, transfiziert. Die Aktivität der *Firefly*-Luziferase wurde nach 48 h luminometrisch bestimmt und die Messwerte mit der internen Kontrolle (*Renilla*-Luziferase) normalisiert (Abb. 16).

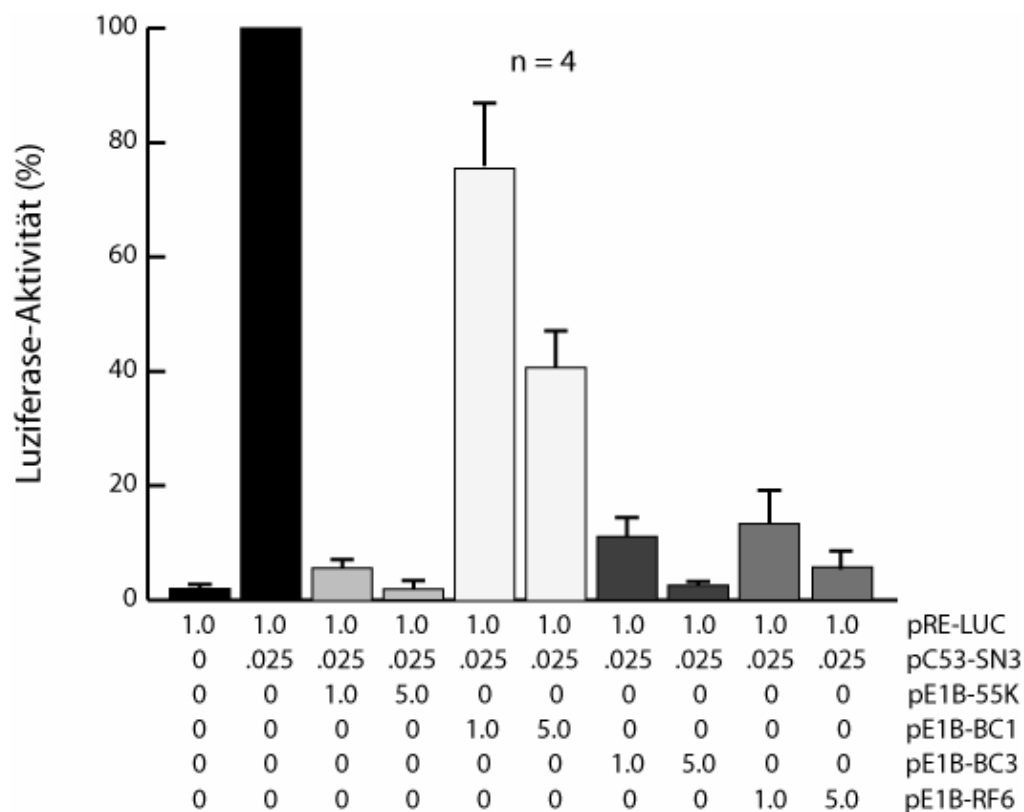


Abb. 16 E1B-55K-abhängige Inhibition der p53-stimulierten Transkription von pRE-LUC

2×10^5 H1299-Zellen wurden in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (6-well Schale; Falcon) ausgesät und am nächsten Tag mit $1 \mu\text{g}$ pRL-TK (interne Kontrolle) und den angegebenen Mengen pRE-LUC, pC53-SN3 (pCMV-p53) und $1 \mu\text{g}$ oder $5 \mu\text{g}$ pcDNA3 (Vektor) bzw. pcDNA-E1B-Plasmiden transfiziert (siehe 4.5). Nach 48 h wurden die Zellen mit Lyse-Puffer aufgeschlossen und die Aktivität der *Firefly*-Luziferase in den Transformationsansätzen mit dem *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega) bestimmt. Die Aktivität der *Firefly*-Luziferase in Gegenwart von Wildtyp p53 (pC53-SN3) wurde als Referenzwert auf 100 % normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus vier unabhängigen Versuchen.

Das E1B-55K-Wildtypprotein war in der Lage die p53-vermittelte Transkriptionsaktivierung fast vollständig zu inhibieren (Abb. 16). Unter den gewählten Bedingungen wurden Restaktivitäten von etwa 5% ($1 \mu\text{g}$ pE1B-55K) und 1% ($5 \mu\text{g}$ pE1B-55K) im Vergleich zum Kontrollansatz ohne pE1B-55K ermittelt. Von den BC-Box-Mutanten zeigte E1B-BC3 mit Restaktivitäten von 9% bzw. 2% eine zum Wildtypprotein vergleichbar starke Inhibition, während E1B-BC1 die p53-abhängige Aktivierung des pRE-Promotors nur noch auf 77% bzw. 40% reduzierte. Interessanterweise war die transformationsdefekte Mutante E1B-RF6 mit 16% bzw.

5% *Firefly*-Luziferaseaktivität noch deutlich in der Lage die Transkriptionsrate des Reportergens zu inhibieren.

Um zu überprüfen, ob sich die mit pRE-LUC erhaltenen Ergebnisse auch auf ein p53-kontrolliertes zelluläres Gen übertragen lassen, wurden die Versuche mit pcyclinG-LUC wiederholt. Dafür wurden wie unter 4.5 beschrieben, p53-negative H1299-Zellen mit dem Reportergenkonstrukt pcyclinG-LUC und den in Abb.17 aufgeführten Expressionsplasmiden transfiziert. Die Aktivität der *Firefly*-Luziferase wurde 48 h nach Transfektion luminometrisch bestimmt und die Messwerte mit der internen *Renilla*-Luziferase-Kontrolle normalisiert (Abb. 17).

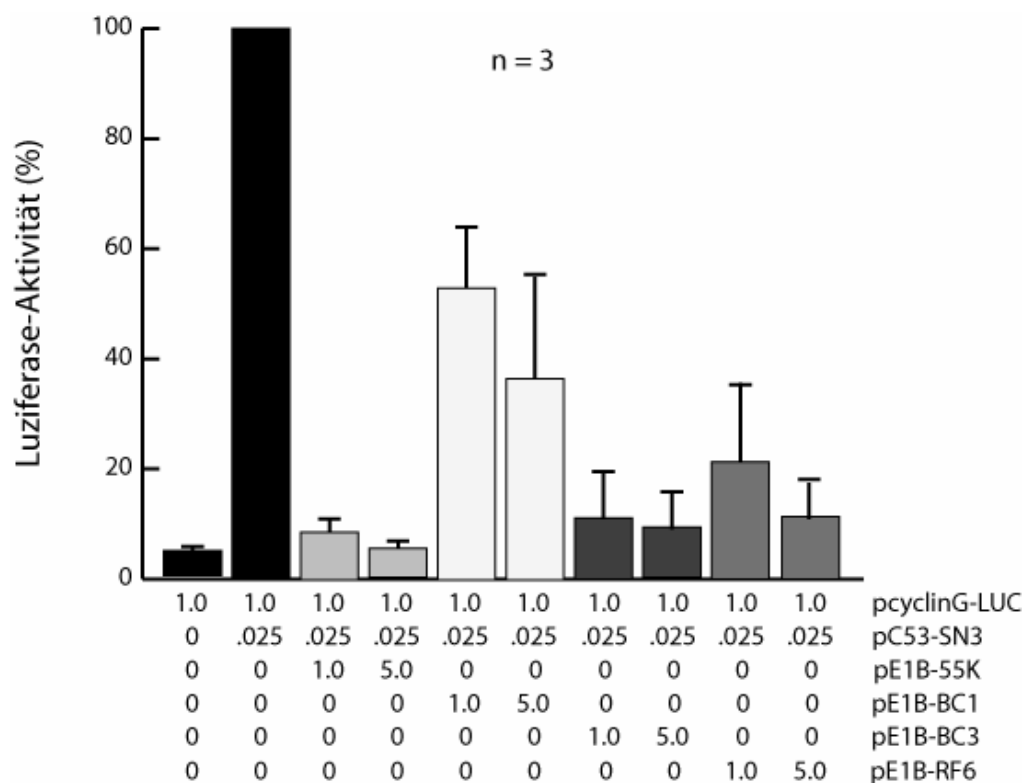


Abb. 17 E1B-55K-abhängige Inhibition der p53-stimulierten Transkription von pcyclinG-LUC

2×10^5 H1299-Zellen wurden in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (6-well Schale; Falcon) ausgesät und am nächsten Tag mit $1 \mu\text{g}$ pRL-TK (interne Kontrolle) und den angegebenen Mengen pcyclinG-LUC, pC53-SN3 (pCMV-p53) und $1 \mu\text{g}$ oder $5 \mu\text{g}$ pcDNA3 (Vektor) bzw. pcDNA-E1B-Plasmiden transfiziert (siehe 4.5). Nach 48 h wurden die Zellen mit Lyse-Puffer aufgeschlossen und die Aktivität der *Firefly*-Luziferase in den Transfektionsansätzen mit dem *Dual-Luciferase*[®] Reporter Assay System (Promega) bestimmt. Die Aktivität der *Firefly*-Luziferase in Gegenwart von Wildtyp p53 (pC53-SN3) wurde als Referenzwert auf 100% normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

Analog zu den Versuchen mit pRE-LUC, wurde die p53-vermittelte Transkriptionsaktivierung des CyclinG-Promotors durch das E1B-55K-Wildtypprotein und E1B-BC3 mit Restaktivitäten von etwa 5% (1 µg pE1B-55K) bzw. 9% (1 µg pE1B-BC3) stark reprimiert. Auch die transformationsdefekten Mutanten E1B-BC1 und E1B-RF6 ergaben erneut vergleichbare Resultate. E1B-BC1 war mit *Firefly*-Luziferaseaktivitäten von 49% bzw. 36% wiederum in ihrer Fähigkeit eingeschränkt der p53-vermittelten Transkriptionsaktivierung entgegenzuwirken. Auch E1B-RF6 zeigte mit 22% bzw. 12% *Firefly*-Luziferaseaktivität noch eine deutliche Repression des cyclinG-Promotors.

Um auszuschließen, dass die unterschiedlichen Phänotypen der E1B-Mutanten nicht auf verschiedenen Expressionsraten oder Stabilitäten der E1B-Proteine beruhen, wurden die Gleichgewichtsmengen der Proteine mit Gesamtzellextrakten aus den Reportergergenversuchen mit pRE-LUC und pcyclinG-Luc durch *Western Blot*-Analysen bestimmt (Abb. 18).

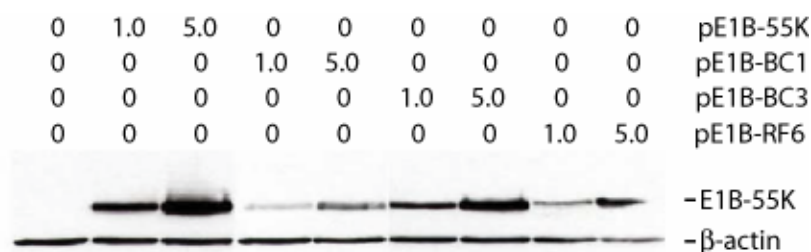


Abb. 18 Gleichgewichtsmengen von E1B-55K-Wildtyp, E1B-BC1, E1B-BC3 und E1B-RF6

Die Proteinproben aus dem Luziferase-Assay (Abb. 17) wurden über ein 10%iges-SDS-Gel aufgetrennt, wobei die aufgetragenen Proteinmengen mittels der *Renilla*-Luziferase-Aktivität angeglichen wurden. Die Proteine wurden durch *Western Blot* auf Nitrozellulose übertragen und die Gleichgewichtsmengen der E1B-Proteine mit Hilfe des anti-E1B-55K Antikörpers 2A6 bestimmt. Der Nachweis des β -actin-Proteins durch AC-15 diente als Ladekontrolle.

Die Auswertung dieser Versuche ergab, dass beträchtliche Unterschiede in den Gleichgewichtsmengen der E1B-Mutanten im Vergleich zum Wildtypprotein vorliegen. Der größte Unterschied war für die Mutante E1B-BC1 zu beobachten. Dies lässt vermuten, dass die C180S/C184T-Substitutionen in E1B-BC1 die Stabilität des Proteins erheblich vermindern. In den Gesamtzellextrakten mit E1B-BC3 und E1B-RF6 waren die Gleichgewichtsmengen leicht reduziert. Aufgrund dieser Ergebnisse

muss man annehmen, dass die starken Defekte der E1B-BC1-Mutante in beiden Reportergergenversuchen und den Transformationsexperimenten mit dem Stabilitätsverlust des Proteins in Verbindung stehen, während die Aminosäureaustausche bei E1B-RF6 hauptsächlich die Funktion des Proteins hinsichtlich seiner transformations- und nicht seiner transkriptionsaktiven Aktivitäten fast vollständig inaktivieren. Im Gegensatz dazu verhält sich die C184T-Substitution in E1B-BC3 scheinbar erneut neutral.

5.2.3.2 Reportergergenversuche mit p53-unabhängigem Promotor

In abschließenden Reportergergenversuchen wurde überprüft, ob die Aminosäureaustausche die intrinsische Repressoraktivität des E1B-55K-Proteins beeinflussen. Die theoretische Grundlage für diese Experimente basiert auf der Beobachtung, dass Ad2/5 oder Ad12 E1B-55K als Fusionsprotein mit der Gal4-DNA-Bindedomäne aus *S. cerevisiae*, die Transkription von Promotoren mit Gal4-DNA-Bindestellen effizient reprimiert (Yew et al., 1994). Diese Aktivität ist dabei unabhängig von p53 und wird durch den C-terminalen Bereich der viralen Proteine über die Wechselwirkung mit zellulären Korepressoren vermittelt (Martin und Berk, 1999).

Zur Durchführung dieser Analysen wurden die vollständigen cDNAs der E1B-Mutanten zunächst in den Plasmidvektor pG4 kloniert, der die Expression von Fremdgenen als Gal4-Fusionsproteine unter der Kontrolle eines viralen Promotors ermöglicht. Anschließend wurden H1299-Zellen, wie unter 4.5 beschrieben, mit dem Reporterplasmid pGalTK-Luc und den verschiedenen Gal4-E1B-Expressionsplasmiden transfiziert. Das Plasmid pGalTK-LUC enthält fünf DNA-Bindestellen für Gal4 im Kontext des starken Thymidinkinase-Promotors (TK) von Herpes Simplex Virus Typ-1 (HSV-1). Nach 48 h wurde die Aktivität der *Firefly*-Luziferase luminometrisch bestimmt und die Messwerte gegen die interne *Renilla*-Luziferaseaktivität normalisiert (Abb. 19 A). Parallel dazu wurden die Gleichgewichtsmengen der Gal4-E1B-Fusionsproteine durch *Western Blot*-Analysen bestimmt (Abb. 19 B).

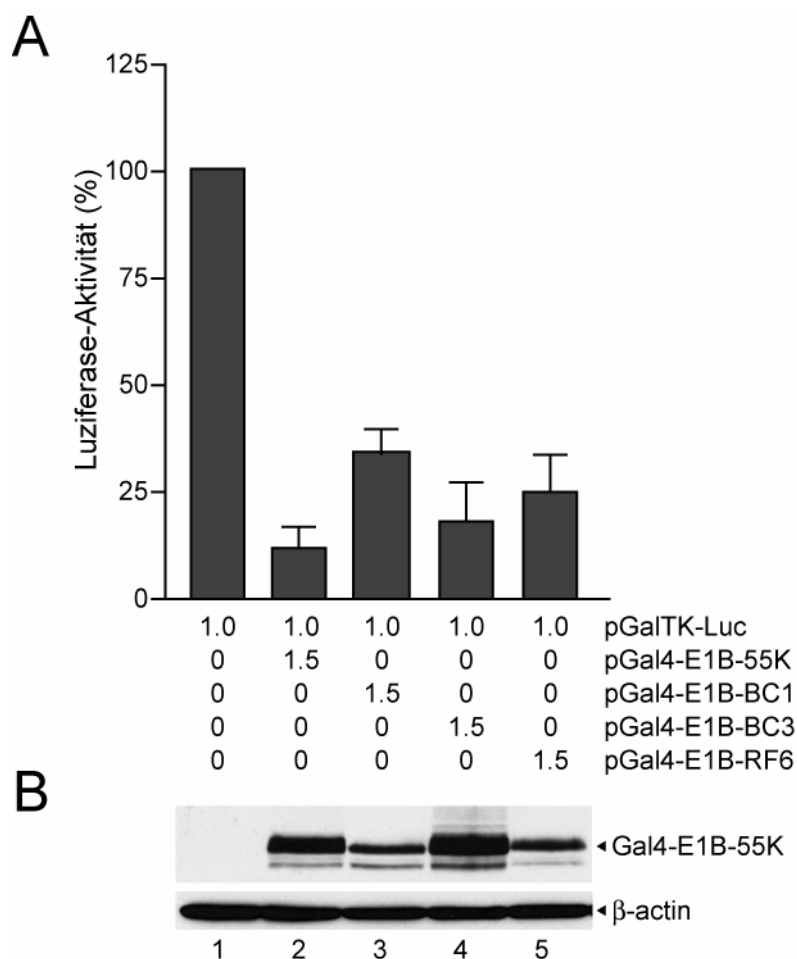


Abb. 19 Gal4-E1B-55K-abhängige Repression von pGalTK-Luc

(A) 2×10^5 H1299-Zellen wurden in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (6-well Schale; Falcon) ausgesät und am nächsten Tag mit $1 \mu\text{g}$ pRL-TK (interne Kontrolle), $1 \mu\text{g}$ und $1,5 \mu\text{g}$ Vektor bzw. pGal4-E1B-Konstrukten transfiziert (siehe 4.5). Nach 48 h wurden die Zellen mit Lyse-Puffer aufgeschlossen und die *Firefly*-Luziferase-Aktivität mit dem *Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System* (Promega) bestimmt. Die *Firefly*-Luziferase-Aktivität des Reporterplasmids pGalTK-Luc wurde als Referenzwert auf 100% normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. (B) Parallel dazu wurden die Proteinproben aus den Transfektionen über ein 10%iges-SDS-Gel aufgetrennt, wobei die aufgetragenen Mengen mittels der *Renilla*-Luziferase-Aktivität angeglichen wurden. Die Proteine wurden durch *Western Blot* auf Nitrozellulose übertragen und anschließend die Gleichgewichtsmengen der E1B-Proteine mit Hilfe des anti-E1B-Antikörpers 2A6 bestimmt. Der Nachweis des β -actin-Proteins erfolgte durch den Antikörper AC-15 und diente als Ladekontrolle.

Wie aus Abb. 19 A hervorgeht wurde die Aktivität des GalTK-Promotors durch alle getesteten Gal4-E1B-Fusionsproteine reprimiert, wobei die unterschiedlichen *Firefly*-Luziferase-Aktivitäten in den Transfektionsansätzen mit den verschiedenen Gleichgewichtsmengen der Gal4-E1B-Proteine in den *Western Blot*-Analysen übereinstim-

men (Abb. 19 B, Spuren 1 bis 5). Folglich haben die Aminosäureaustausche in der BC-Box und der RING-Fingerdomäne keinen negativen Einfluss auf die intrinsische Repressoraktivität des E1B-55K-Proteins. Ausserdem bestätigen diese Ergebnisse die Annahme, dass dem Phänotyp der E1B-BC1-Mutante kein Funktions- sondern ein Stabilitätsverlust des Proteins zugrunde liegen muss.

Im Ganzen zeigen die Ergebnisse der Transformations- und Reporter-genversuche, dass die eingeführten Aminosäureaustausche in der BC-Box die biologischen Eigenschaften des Ad5 E1B-55K-Proteins in den überprüften Testsystemen unterschiedlich beeinflussen. Während die E1B-BC3-Mutante (C184T) keine deutlichen Defekte im Vergleich zum Wildtypprotein aufzeigt, haben die L180P/C184F-Substitutionen in E1B-BC1 einen stark negativen Einfluss auf die *Focus*-Bildung primärer BRK-Zellen (Abb. 15), Repression p53-abhängiger Transkription (Abb. 16+17) und Proteinstabilität (Abb. 18). Der Phänotyp von E1B-BC1 folgt somit dem klassischen Modell, dass das transformierende Potenzial des E1B-55K-Proteins über die Inaktivierung von p53 bzw. p53-regulierter Transkription vermittelt wird.

Ein komplett anderes Bild ergibt sich für die Mutante E1B-RF6. Im Unterschied zu E1B-BC1 kann die in den Transformationsversuchen beobachtete Abnahme der *Focus*-Bildung nicht durch den Verlust der Proteinstabilität oder Repression p53-abhängiger bzw. -unabhängiger Transkription erklärt werden. Vielmehr weisen die Ergebnisse erstmals darauf hin, dass durch die Aminosäureaustausche in der vermeintlichen RING-Fingerdomäne eine wichtige, transformationsaktive Funktion des E1B-55K-Proteins verändert wurde, die normalerweise über einen p53-unabhängigen Mechanismus zur vollständigen Zelltransformation beiträgt. Aufgrund dieser hoch interessanten Beobachtung wurde in weiterführenden Analysen versucht diesen Mechanismus zu identifizieren.

5.2.4 Mutationen in der RING-Fingerdomäne verändern die subzelluläre Lokalisation von E1B-55K in stabil transformierten BRK-Zellen

Im ersten Schritt dieser Arbeiten wurde zuerst die subzelluläre Verteilung von E1B-RF6 mit den BC-Box-Mutanten und dem Wildtypprotein in Doppelmarkierungsexperimenten und anschließender indirekter Immunfluoreszenz verglichen (Abb. 20). Gleichzeitig wurde der Einfluss der Aminosäureaustausche auf die *Steady state*-Lokalisation von p53 und PML überprüft. Zur Durchführung dieser Versuche wurden die stabil transformierten BRK-Zelllinien AB120, AB53, AB57 und AB72 verwendet, die im Rahmen der Transformationsversuche mit pE1B-BC1, pE1B-BC3 und pE1B-RF6 aus den *Foci* der entsprechenden Transfektionsansätze etabliert wurden (vergl. 5.2.2).

Mit Ausnahme der Mutante E1B-BC3 zeigten E1B-BC1 und E1B-RF6 eine im Vergleich zum Wildtypprotein deutlich veränderte intrazelluläre Lokalisation. Analog zu E1B-55K in AB120-Zellen (Abb. 20, a-c) akkumulierte E1B-BC3 zusammen mit p53 in einem großen, perinukleären Proteinkomplex (Abb. 20, m-o). Dies bestätigt erneut die Annahme, dass die C184T-Substitution keinen Einfluss auf die biologischen Aktivitäten des viralen Polypeptids hat. Im Gegensatz dazu ergab die Immunfärbung von E1B-BC1 in AB53-Zellen nur ein schwaches Signal, was vermutlich die verminderte Stabilität der Mutante widerspiegelt (Abb. 20, g-i). In nahezu allen AB53-Zellen waren E1B-BC1 und p53 homogen über das Zytoplasma bzw. den gesamten Zellkern verteilt (Abb. 20, g-i), und nur in 1% der Zellen konnte ein perinukleärer E1B-55K/p53-positiver Proteinkomplex beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

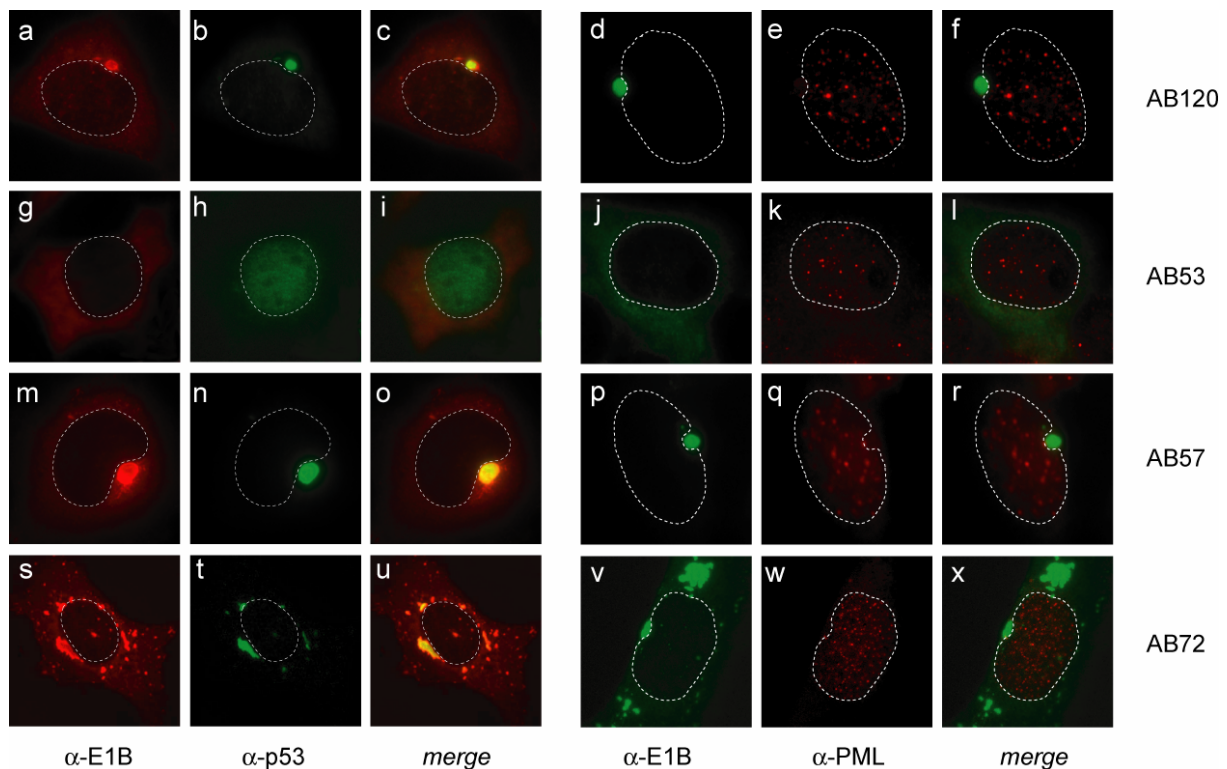


Abb. 20 *Steady state*-Lokalisation von E1B-55K-Wildtyp, E1B-BC1, E1B-BC3, E1B-RF6, E1B-NES zusammen mit p53 und PML in transformierten BRK-Zelllinien

AB120- (E1B-55K; a-f), AB53- (E1B-BC1; g-l), AB57- (E1B-BC3; m-r) und AB72-Zellen (E1B-RF6; s-x) wurden *in situ* mit dem anti-E1B-Antikörper 2A6 aus Maus und dem anti-p53-Antikörper FL393 aus Kaninchen oder dem anti-E1B-Antikörper 7C11 aus Ratte und dem anti-PML-Antikörper 5E10 aus Maus doppelmarkiert. Diese wurden wiederum mit den anti-Maus-Texasrot-, anti-Kaninchen-FITC- oder anti-Ratte-FITC gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert. Die Überlagerungen (*merge*) der Lokalisationen von E1B (rot, a, g, m, s und grün d, j, p, v), p53 (grün, b, h, n, t) und PML (rot, e, k, q, w) sind in c, f, i, l, o, r, u und x dargestellt. Die gestrichelten Linien in den Bildern geben jeweils die Lage und Größe des Zellkerns an.

Ein vollständig anderes Verteilungsmuster ergab die Immunfärbung für die Mutante E1B-RF6 in AB72-Zellen. Neben einer diffusen Verteilung im Zytoplasma konnte die E1B-RF6-Mutante zusätzlich in zahlreichen zytoplasmatischen Aggregaten nachgewiesen werden (Abb. 19, s+v). Interessanterweise hatten diese Strukturen fast vollständig die typische Form des perinukleären Proteinkomplexes verloren und wiesen nur noch zum Teil eine kernnahe Verteilung auf. Nur in einigen dieser Aggregate wurde eine Kolo-kalisation mit p53 beobachtet (Abb. 19, s-u). Trotz dieser unterschiedlichen Verteilung der E1B-Mutante wurde kein Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von PML festgestellt. Auch in allen anderen BRK-Zelllinien wies PML die typische, punktförmige Verteilung im Zellkern auf (Abb. 20, d-f, j-l, p-r und v-x).

Die Ergebnisse der Immunfärbungen lassen deshalb vermuten, dass der Phänotyp der E1B-RF6-Mutante zumindest mit der deutlich veränderten Lokalisation im Zytoplasma gekoppelt ist.

5.2.5 Mutationen in der RING-Fingerdomäne verhindern die Ausbildung p53/PML-positiver subnukleärer Aggregate

Eine weitere Erklärung für den Phänotyp der E1B-RF6-Mutante bietet die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass Veränderungen der *Steady state*-Lokalisation von E1B-55K maßgeblich seine transformierenden und onkogenen Eigenschaften beeinflussen (5.1.2–5.1.5). Beispielsweise, steht die gesteigerte *Focus*-Bildung durch E1B-NES in engem Zusammenhang mit der Umverteilung von p53, PML und daxx in subnukleäre Proteinaggregate (5.1.4), die auch in Anwesenheit des CRM1-Inhibitors LMB ausgebildet werden. Deshalb wurde im nächsten Schritt dieser Analysen der Einfluss der CRM1-abhängigen Kernexportfunktion auf die intrazelluläre Verteilung von E1B-RF6, p53 und PML im Vergleich zu den anderen E1B-Mutanten durch indirekte Immunfluoreszenz bestimmt (Abb. 21). Dazu wurden die BRK-Zelllinien für 3 h mit LMB behandelt, fixiert und Doppelmarkierungsexperimente durchgeführt.

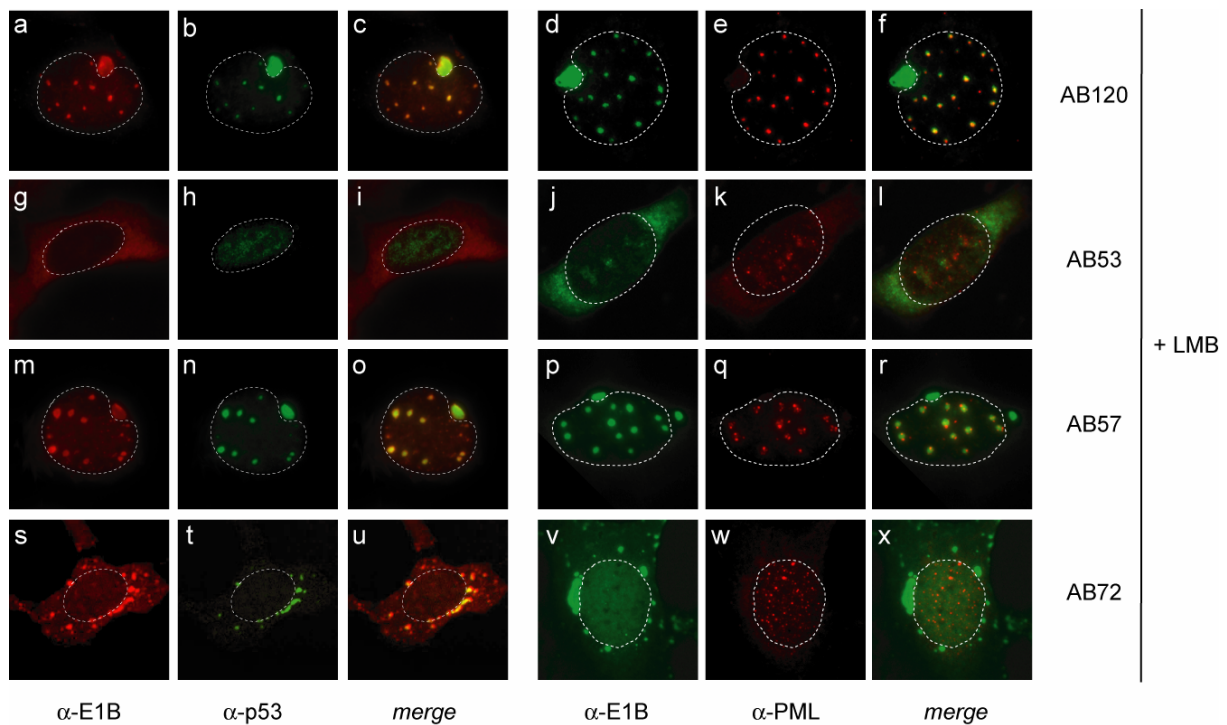


Abb. 21 Einfluss von LMB auf die *Steady state*-Lokalisation von E1B-55K-Wildtyp, E1B-BC1, E1B-BC3, E1B-RF6, p53 und PML in transformierten BRK-Zelllinien

AB120- (E1B-55K; a-f), AB53- (E1B-BC1; g-l), AB57- (E1B-BC3; m-r) und AB72-Zellen (E1B-RF6; s-x), die 3 h vor der Fixierung mit 10 nM LMB inkubiert wurden, wurden *in situ* mit dem anti-E1B-Antikörper 2A6 aus Maus und dem anti-p53-Antikörper FL393 aus Kaninchen oder dem anti-E1B-Antikörper 7C11 aus Ratte und dem anti-PML-Antikörper 5E10 aus Maus doppelmarkiert. Diese wurden wiederum mit den anti-Maus-Texasrot-, anti-Kaninchen-FITC- oder anti-Ratte-FITC-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert. Die Überlagerungen (*merge*) der Lokalisationen von E1B (rot, a, g, m, s und grün d, j, p, v), p53 (grün, b, h, n, t) und PML (rot, e, k, q, w) sind in c, f, i, l, o, r, u und x dargestellt. Die gestrichelten Linien in den Bildern geben jeweils die Lage und Größe des Zellkerns an.

Wie erwartet akkumulierte E1B-55K in AB120-Zellen (Abb. 21, a-f) und auch E1B-BC3 in AB57-Zellen (Abb. 21, m-r) zusammen mit p53 oder PML in subnukleären, globulären Strukturen. Deutlich weniger stark ausgeprägte und kleinere Kernaggregate wurden auch vereinzelt in einigen AB53-Zellen nachgewiesen (Abb. 21, g-l). Im Unterschied dazu führte die Anwesenheit von LMB in keiner der untersuchten AB72-Zellen zur Ausbildung E1B-55K/p53- oder E1B-55K/PML-positiver Kernstrukturen, obwohl E1B-RF6 deutlich in einer diffusen Verteilung im Zellkern akkumulierte (Abb. 21, s-x). Diese Ergebnisse zeigen, dass die LMB-vermittelte Inhibition des CRM1-abhängigen Kernexports von E1B-55K, E1B-BC1 und E1B-BC3, wie erwartet, die nukleäre Akkumulation und Ausbildung kernständiger Aggregate

induziert, die E1B-55K, p53 und PML enthalten. Offensichtlich wird dieser Vorgang durch die C454S/C456S-Substitutionen in E1B-RF6 blockiert.

Eine einfache Erklärung für diese Beobachtungen ist, dass die Ausbildung dieser Strukturen über die Wechselwirkung von E1B-55K mit PML-NB-assoziierten Proteinen vermittelt wird und die Aminosäureaustausche in der vermeintlichen RING-Fingerdomäne diesen Vorgang verhindern. Als ein denkbarer Interaktionspartner kommt dabei an erster Stelle das daxx-Protein in Frage, das bekanntermaßen mit dem C-Terminus von E1B-55K interagiert (Zhao *et al.*, 2003). Weiterhin könnte die Bindung an PML eine Rolle spielen, obgleich es bislang noch keine Hinweise über eine direkte Wechselwirkung zwischen E1B-55K und diesem PML-NB-assoziierten Tumorsuppressorprotein gibt.

5.2.6 Mutationen in der RING-Fingerdomäne verhindern nicht die Wechselwirkung mit PML und daxx in stabil transformierten BRK-Zellen

Zur Überprüfung dieser Arbeitshypothese wurde die Bindung von Wildtyp-E1B-55K und der E1B-Mutanten an daxx, PML und p53 getestet. Dazu wurden kombinierte Koimmunpräzipitations-/Western Blot-Versuche mit Gesamtzellextrakten aus den transformierten BRK-Zelllinien durchgeführt (Abb. 22 B). Als Kontrollen wurden Gesamtzellextrakte aus den E1B-NES-exprimierenden Zellklonen AB18 und AB115 (siehe 5.1.3) und aus spontan immortalisierten BRK1-Zellen verwendet. Zugleich wurden die Gleichgewichtsmengen der untersuchten Proteine in den BRK-Zelllinien durch Western Blot-Analysen bestimmt (Abb. 22 A).

In Übereinstimmung mit den Daten aus den Immunfluoreszenzanalysen (5.2.4-5.2.5) akkumulierten, mit Ausnahme der instabilen E1B-BC1-Mutante, alle E1B- und p53-Proteine in vergleichbar großen Mengen (Abb. 22 A, Spuren 2-7). Die gleichzeitige Reduktion von p53 in AB53-Zellen (Abb. 22 A, Spur 3), spiegelt die Tatsache wider, dass die Stabilisierung des Tumorsuppressorproteins in Ad2/5 E1A/E1B-transformierten Zellen vor allem durch E1B-55K determiniert wird (van den Heuvel

et al., 1993). Im Unterschied zu p53 waren die Gleichgewichtsmengen der verschiedenen PML-Isoformen (Jensen *et al.*, 2001) in allen transformierten, nicht aber spontan immortalisierten BRK-Zelllinien erhöht (Abb. 22 A, Spuren 2-7). Dieser Befund war überraschend und zeigt erstmalig, dass auch das PML-NB-assoziierte PML-Protein in vollständig transformierten BRK-Zellen durch E1A und/oder E1B-55K über einen noch unbekanntem Mechanismus stark akkumuliert. Dieser Effekt scheint spezifisch für PML zu sein, da für die PML-NB-Komponente daxx kein deutlicher Unterschied zwischen BRK1-Zellen (Abb. 22 A, Spur 1) und den E1A/E1B-transformierten Zellklonen erkennbar war (Abb. 22 A, Spuren 2-7).

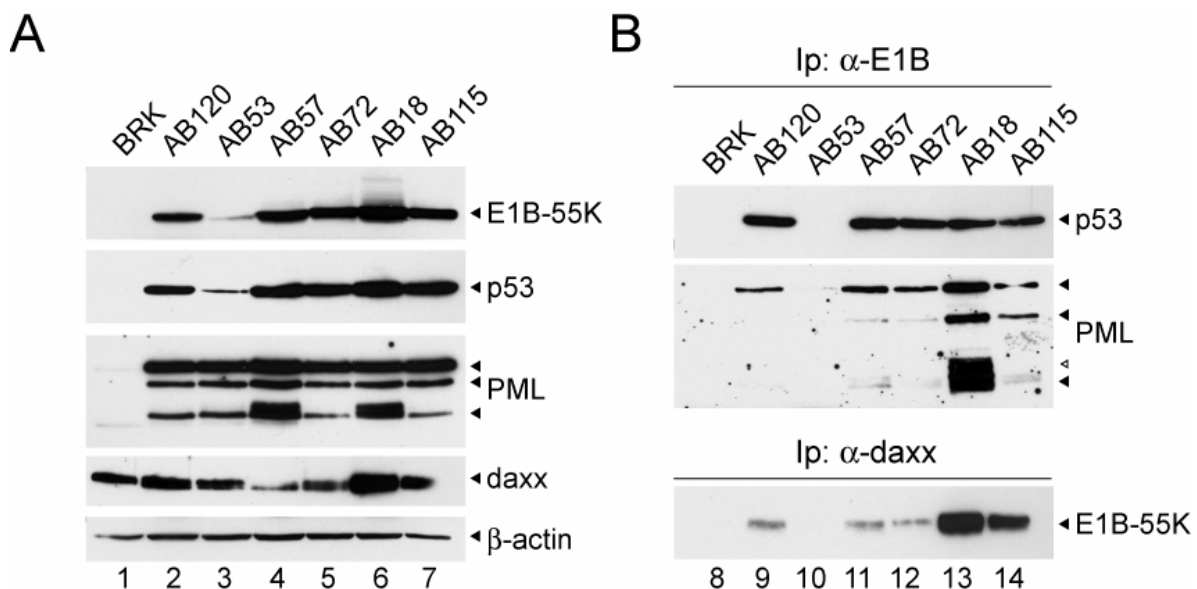


Abb. 22 Bindung von p53, PML und daxx an E1B-55K und E1B-Mutanten in BRK-Zellen

Subkonfluente BRK- (A Spur 1, B Spur 8), AB120- (E1B-55K; A Spur 2, B Spur 9), AB53- (E1B-BC1; A Spur 3, B Spur 10), AB57- (E1B-BC3; A Spur 4, B Spur 11), AB72- (E1B-RF6; A Spur 5, B Spur 12), AB18- (E1B-NES; A Spur 6, B Spur 13) und AB115-Zellen (E1B-NES; A Spur 7, B Spur 14) wurden geerntet und wie unter 4.4.2 beschrieben lysiert. (A) Zur Überprüfung der Expression wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (50 µg für E1B, p53 und β-actin; 100 µg für PML und daxx) mittels 10%iger (E1B, p53, PML und β-actin) oder 8%iger (daxx) SDS-Gele aufgetrennt, durch *Western Blot* auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen E1B (2A6), p53 (FL393), PML (5E10), daxx oder β-actin (AC-15) als Ladekontrolle inkubiert. (B) Zur Koimmunpräzipitation der verschiedenen E1B-Mutanten mit p53 und PML wurde das Zelllysate vor dem *Western Blot* mit dem E1B-Antikörper 2A6, zur Koimmunpräzipitation mit daxx mit dem anti-daxx-Antikörper immunpräzipitiert (siehe 4.4.6) und dann über 10%ige SDS-Gele aufgetrennt. Anschließend mittels *Western Blot* auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen p53 (FL393), PML (5E10) oder E1B (2A6) inkubiert.

Zur Überprüfung der Bindung von E1B-55K an PML, daxx und p53 wurden schließlich zwei verschiedene Koimmunpräzipitationsversuche durchgeführt (Abb. 22 B). Für die Wechselwirkung mit p53 und PML wurde ein E1B-55K-spezifischer Antikörper (α -E1B) eingesetzt, während für die daxx-Interaktion ein anti-daxx-Antikörper (α -daxx) verwendet wurde. Anschließend wurden die kopräzipitierten Proteine mittels *Western Blot* und Immunfärbung detektiert. Die Auswertung dieser Versuche zeigte erstmalig dass, Wildtyp-E1B-55K in transformierten BRK-Zellen neben p53 und daxx auch mit verschiedenen Isoformen von PML interagiert (Abb. 22 B, Spuren 9). Eine Bindung der instabilen E1B-BC1-Mutante mit p53, PML und daxx wurde aufgrund der geringen Gleichgewichtsmengen des viralen Proteins nicht beobachtet (Abb. 22 B, Spur 10). Im Gegensatz dazu hatten die Aminosäureaustausche in BC3, der RING-Fingerdomäne und dem NES keinen negativen Einfluss auf die p53-, PML- bzw. daxx-Interaktion (Abb. 22 B, Spuren 11-14). Stattdessen wurde insbesondere in AB18-Zellen eine deutlich größere Menge an PML-Isoformen und daxx immunpräzipitiert (Abb. 22 B, Spur 13), was vermutlich direkt mit der Akkumulation dieser Proteine in den großen globulären E1B-NES-positiven-Kernstrukturen in Verbindung steht (Abb. 9-12). Gegen diese Annahme spricht jedoch vorläufig die Tatsache, dass aus allen Gesamtzellextrakten gleiche Mengen von p53 präzipitiert wurden (Abb. 22 B, Spuren 9-14), obwohl das Tumorsuppressorprotein in AB18/115-Zellen ebenfalls in hohen Konzentration mit dem E1B-NES-Protein in den Kernstrukturen vorliegt (Abb. 9-10). Zur Aufklärung dieses Sachverhalts bedarf es deshalb noch weiterer Untersuchungen.

Die positiven Ergebnisse der Koimmunpräzipitations-/*Western Blot*-Analysen widerlegen die Annahme, dass die Aggregation von E1B-55K mit PML und daxx in globulären Kernstrukturen über die Wechselwirkung des viralen Proteins mit diesen zellulären Faktoren induziert wird. Ebenso kann die veränderte nukleäre Lokalisation von E1B-RF6 in LMB-behandelten AB72-Zellen nicht mit dem Verlust der Bindung an PML und daxx in Verbindung stehen. Trotzdem liegt der Verdacht nahe, dass möglicherweise andere PML-NB-Komponenten als Interaktionspartner von E1B-55K für die Ausbildung dieser Strukturen verantwortlich sind.

5.2.7 Mutationen in der RING-Fingerdomäne verhindern die Bindung von E1B-55K an Mre11

Wie bereits erwähnt wurde kürzlich mit Mre11 ein neuer Bindungspartner des Ad5 E1B-55K-Proteins identifiziert (Carson et al., 2003; Blanchette *et al.*, 2004). Mre11 ist zentraler Bestandteil des trimeren DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturkomplexes Mre11/Rad50/NBS1 (MRN) und ist interessanterweise auch mit PML-NBs assoziiert. Aufgrund dieser Beobachtungen und der oben beschriebenen Ergebnisse war es naheliegend die Bindung der E1B-Mutanten an Mre11 zu überprüfen. Dazu wurden wiederum Immunpräzipitationsexperimente mit Gesamtzellextrakten aus den BRK-Zelllinien durchgeführt (Abb. 23). Die Interaktion der E1B-Proteine mit Mre11 wurde in der Immunpräzipitation mit einem E1B-55K-spezifischen Antikörper (α -E1B) und im *Western Blot* mit einem anti-Mre11-Antikörper nachgewiesen

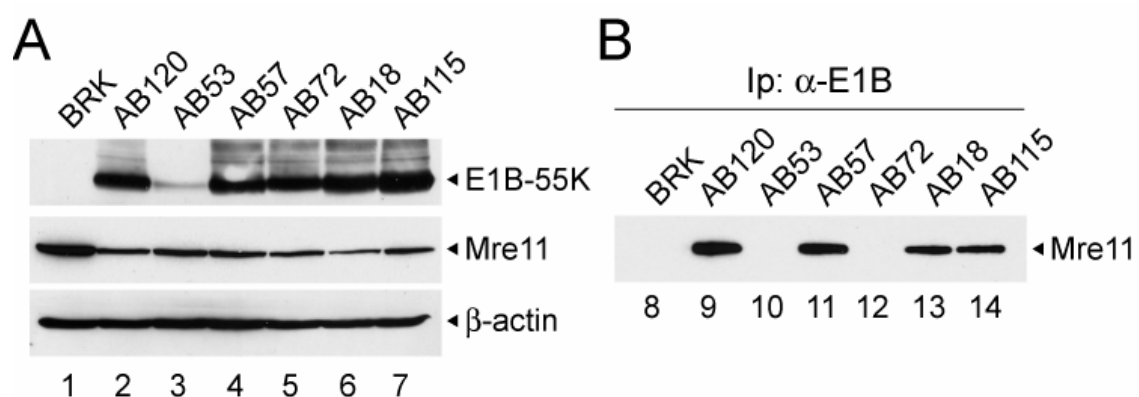


Abb. 23 Bindung von Mre11 an E1B-55K und E1B-Mutanten in BRK-Zelllinien

Subkonfluente BRK- (A Spur 1, B Spur 8), AB120- (E1B-55K; A Spur 2, B Spur 9), AB53- (E1B-BC1; A Spur 3, B Spur 10), AB57- (E1B-BC3; A Spur 4, B Spur 11), AB72- (E1B-RF6; A Spur 5, B Spur 12), AB18- (E1B-NES; A Spur 6, B Spur 13) und AB115-Zellen (E1B-NES; A Spur 7, B Spur 14) wurden geerntet und wie unter 4.4.2 beschrieben lysiert. (A) Zur Überprüfung der Expression wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (50 μ g für E1B und β -actin; 100 μ g für Mre11) mittels 10%iger SDS-Gele aufgetrennt, durch *Western Blot* auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen E1B (2A6), Mre11 oder β -actin (AC-15) als Ladekontrolle inkubiert. (B) Zur Koimmunpräzipitation der verschiedenen E1B-Mutanten mit Mre11 wurde das Zellysate vor dem *Western Blot* mit dem E1B-Antikörper 2A6 immunpräzipitiert (4.4.6) und dann über 10%ige SDS-Gele aufgetrennt. Anschließend mittels *Western Blot* auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen Mre11 inkubiert.

Im Unterschied zu den Untersuchungen mit p53, PML und daxx wurden in allen transformierten BRK-Zelllinien annähernd konstante Gleichgewichtsmengen von

Mre11 detektiert (Abb. 23 A Spuren 2-7), die im Vergleich zu BRK1-Zellen jedoch leicht erniedrigt waren (Abb. 23 A, Spur 1). Die Interaktion mit Mre11 konnte sowohl für das E1B-Wildtypprotein (Abb. 23 B, Spur 9) als auch für die E1B-BC3- (Abb. 23 B, Spur 11) und E1B-NES-Mutanten (Abb. 23 B, Spuren 13 und 14) bestätigt werden. Keine Bindung an Mre11 wurde bei den Mutanten E1B-BC1 und E1B-RF6 beobachtet (Abb. 23 B, Spuren 10 und 12). Während die Abwesenheit der Mre11-Bande bei E1B-BC1 durch die geringen Gleichgewichtsmengen des viralen Proteins begründet werden kann (Abb. 23 A, Spur 3), scheidet diese Tatsache bei E1B-RF6 als Erklärungsmöglichkeit aus, da E1B-RF6 in großen Mengen exprimiert wird (Abb. 23 A, Spur 5). Demzufolge, verhindern die C454S/C456S-Substitutionen in der vermeintlichen RING-Fingerdomäne spezifisch die Bindung an Mre11.

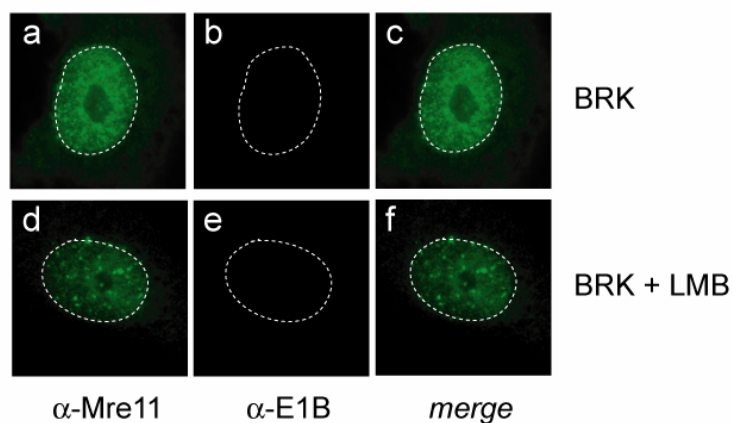
Im Ganzen weisen diese Beobachtungen stark darauf hin, dass die E1B-55K-induzierte Umverteilung von p53, PML und daxx in globuläre Kernstrukturen über die Wechselwirkung mit der PML-NB-Komponente Mre11 gesteuert wird. Außerdem bestätigen sie die Arbeitshypothese, dass die RING-Fingerdomäne eine wichtige, transformationsaktive Funktion des E1B-55K-Proteins reguliert und über einen p53-unabhängigen Mechanismus zur vollständigen Zelltransformation beiträgt. Aufgrund der vorliegenden Daten muss man annehmen, dass dieser Mechanismus über die Modulation von Mre11- und/oder MRN-regulierter zellulärer Prozesse vermittelt wird.

5.2.8 Ad5 E1B-55K sequestriert Mre11 in den perinukeären Proteinkomplex

Die Mre11-abhängige Umverteilung von PML-NBs setzt voraus, dass Mre11 zusammen mit E1B-55K in LMB-behandelten Zellen in diesen Strukturen kolokalisiert während die C454S/C456S-Substitutionen in E1B-RF6 keinen Einfluss auf die Verteilung des zellulären Proteins haben sollten. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Lokalisation von Mre11 in BRK1-Zellen (Abb. 24 A) mit der in stabil transformierten BRK-Zelllinien in An- und Abwesenheit von LMB durch

Doppelmarkierungsexperimente und indirekte Immunfluoreszenz ermittelt (Abb. 24 B).

A



B

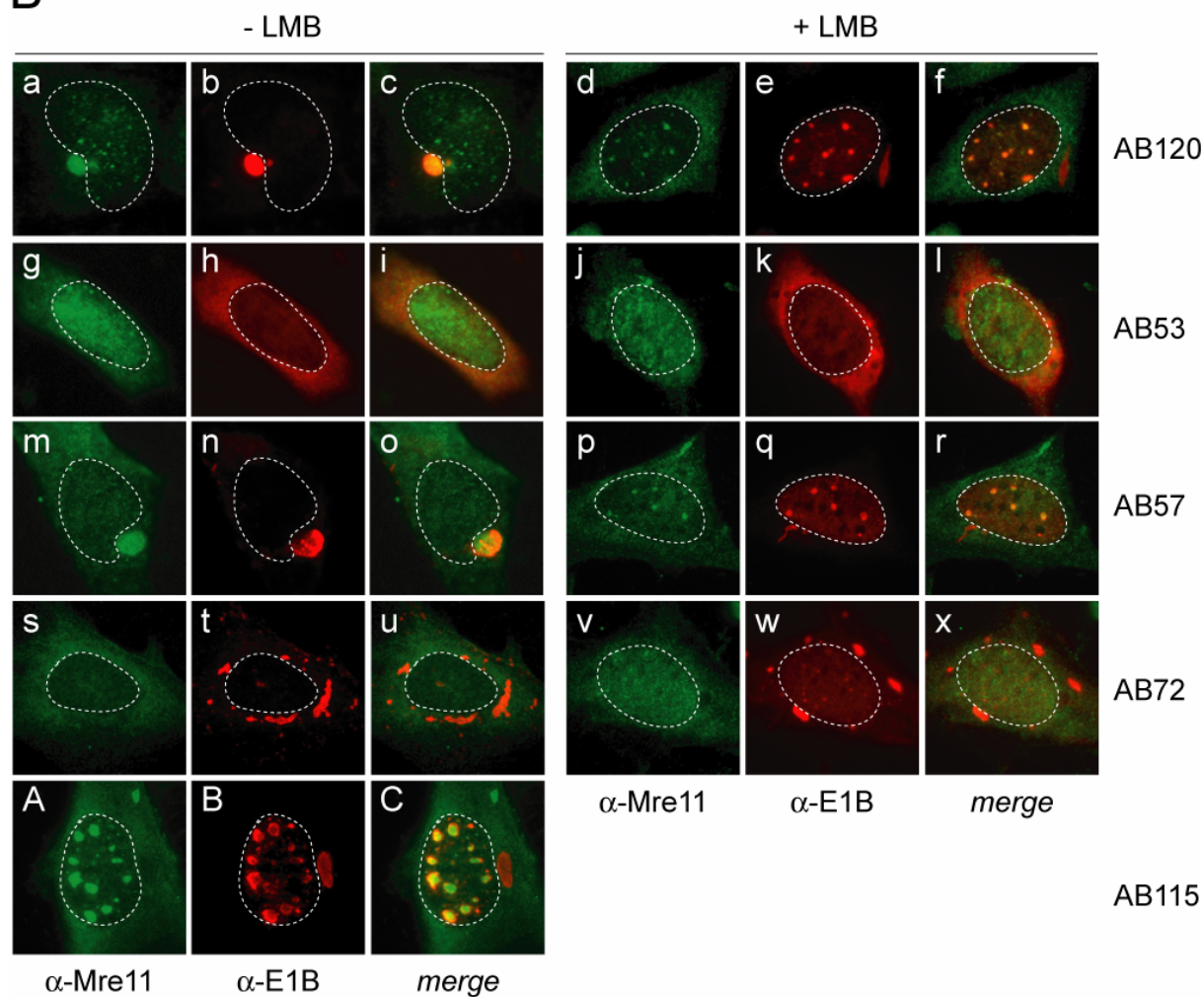


Abb. 24 *Steady state*-Lokalisation von Mre11 in transformierten BRK-Zellen

(A) Spontan immortalisierte BRK1-Zellen, die entweder 3 h vor der Fixierung mit 10 nM LMB inkubiert (d-f) oder nicht behandelt wurden (a-c), wurden *in situ* mit dem anti-E1B-Antikörper 2A6 aus Maus und dem anti-Mre11-Antikörper aus Kaninchen doppelmarkiert. Diese wurden wiederum

mit den anti-Maus-Texasrot- oder anti-Kaninchen-FITC-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert. Die Überlagerungen (*merge*) der Lokalisationen von E1B (rot; b und e) und Mre11 (grün; a und d) sind in c und f dargestellt. (B) AB120- (E1B-55K; a-f), AB53- (E1B-BC1; g-l), AB57- (E1B-BC3; m-r), AB72- (E1B-RF6; s-x), die entweder 3 h vor der Fixierung mit 10 nM LMB inkubiert (d-f, j-l, p-r, v-x) oder nicht behandelt (a-c, g-i, m-o, s-u) wurden und unbehandelte AB115-Zellen (E1B-NES, A-C) als Vergleich, wurden *in situ* mit dem anti-E1B-Antikörper 2A6 aus Maus und dem anti-Mre11-Antikörper aus Kaninchen doppelmarkiert. Diese wurden wiederum mit den anti-Kaninchen-FITC- oder anti-Maus-Texasrot-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert. Die Überlagerungen (*merge*) der Lokalisationen von Mre11 (grün, a, d, g, j, m, p, s, v, A) und E1B (rot, b, e, h, k, n, q, t, w, B) sind in c, f, i, l, o, r, x und C dargestellt. Die gestrichelten Linien in den Bildern geben jeweils die Lage und Größe des Zellkerns an. Vergrößerung x 7600.

Dieser Vergleich zeigte, dass Mre11 tatsächlich in LMB-behandelten AB120- und AB57-Zellen in globulären, E1B-55K-positiven Strukturen lokalisiert (Abb. 24 B, d-f und p-r). Wie vorausgesagt wurden diese Strukturen in AB72-Zellen nicht beobachtet (Abb. 24 B, v-x). Ebenso wurde keine Kolokalisation mit der instabilen E1B-Mutante BC1 in AB53-Zellen festgestellt (Abb. 24 B, j-l). Damit ist Mre11 zumindest einer der PML-NB-assoziierten Faktoren, der zur Umverteilung von PML-NBs und zur Ausbildung der subnukleären Proteinaggregate über die Bindung an die RING-Fingerdomäne von E1B-55K beiträgt. Dafür spricht auch die Tatsache, dass Mre11 in AB115-Zellen zusammen mit E1B-NES in den charakteristischen subnukleären Aggregaten akkumuliert (Abb. 24 B, A-C) und die Beobachtung, dass diese Strukturen in LMB-behandelten AB72-Zellen vollständig fehlen (Abb. 24 B, v-x).

Ein weiteres, überraschendes Ergebnis wurde beim Vergleich der zytoplasmatischen Lokalisation von Mre11 in den verschiedenen Zelllinien erhalten. Wie aus Abb. 24 A hervorgeht, zeigte Mre11 in BRK1-Zellen eine dominante Kernfärbung (Abb. 24 A, a-f), während in allen E1A/E1B-transformierten Zellklonen zusätzlich eine zytoplasmatische Verteilung beobachtet werden konnte (Abb. 24 B, a-x und A-C). Ferner befand sich ein Großteil von Mre11 in AB120- und AB57-Zellen im perinukleären Proteinkomplex (Abb. 24 B, a-c und m-o). Interessanterweise wurde diese Lokalisation in Gegenwart von LMB aufgehoben und es fand scheinbar ein Umverteilung in den Zellkern statt (Abb. 24 B, d-f und p-r). Dies lässt vermuten, dass Mre11, im Unterschied zu p53, vermutlich über die CRM1-abhängige Exportfunktion von E1B-55K in zytoplasmatische Aggregate sequestriert wird. In Übereinstimmung

dazu konnte in AB115-Zellen kein Mre11 im E1B-NES-positiven perinukleären Proteinkomplex nachgewiesen werden (Abb. 24 B, A-C). Wahrscheinlich erfordert diese zytoplasmatische Umverteilung von Mre11 die Bindung an die RING-Fingerdomäne von E1B-55K, da in AB72-Zellen, trotz der zahlreichen E1B-RF6-positiven zytoplasmatischen Aggregate, keine Kolo-kalisation mit Mre11 detektiert werden kann (Abb. 24 B, s-u).

5.2.9 Mutationen in der RING-Fingerdomäne verhindern den proteolytischen Abbau von Mre11 in Kooperation mit Ad5 E4orf6

Im letzten Schritt dieser funktionellen Analysen wurde der Einfluss der Aminosäureaustausche auf den E1B-55K/E4orf6-vermittelten proteolytischen Abbau über den Elongin BC/E3-Ubiquitin-Ligasekomplex untersucht. Nach dem derzeit vorliegenden Modell erfolgt der Abbau in mehreren Schritten, die zunächst die Bindung von E4orf6 an die E3-Ligase und anschließend die Interaktion von E1B-55K mit E4orf6 umfassen. Wahrscheinlich fungiert E1B-55K dabei als Substraterkennungseinheit, die zelluläre Zielproteine wie Mre11 und p53 dem Abbau an Proteasomen zuführt (Querido *et al.*, 2001a; Harada *et al.*, 2002; Blanchette *et al.*, 2004).

Für diese Versuche wurden H1299-Zellen mit den in Abb. 25 angegebenen Expressionsplasmiden transfiziert. Nach 24 h (für den Abbau von p53) bzw. 48 h (für den Abbau von Mre11) wurden die Zellen geerntet und die Gleichgewichtsmengen der Proteine analysiert (Abb. 25).

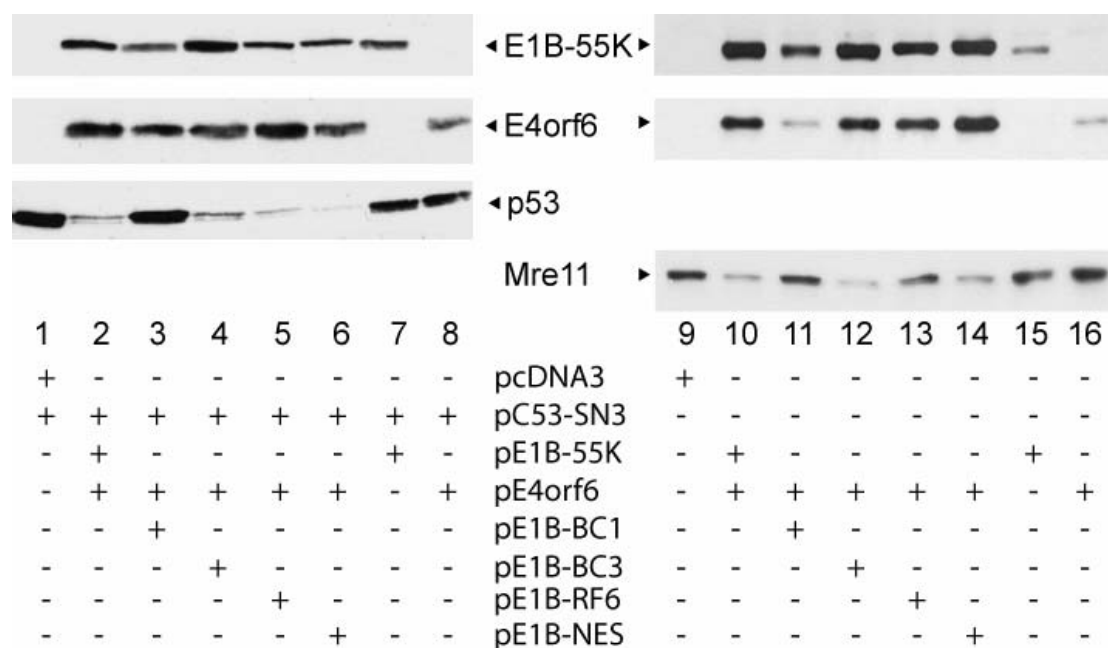


Abb. 25 E1B-55K-vermittelter Abbau von p53 und Mre11 in Kombination mit Ad5 E4orf6

Subkonfluente H1299-Zellen wurden transient mit Plasmiden, die für p53 (pC53-SN3, Spuren 1-8), E1B-55K-Wildtyp (Spuren 2, 7, 10 und 15), E4orf6 (Spuren 2-6, 8, 10-14 und 16), E1B-BC1 (Spuren 3 und 11), E1B-BC3 (Spuren 4 und 12), E1B-RF6 (Spuren 5 und 13) und E1B-NES (Spuren 6 und 14) kodieren nach der Lipofektionsmethode (4.2.3.2) transfiziert. 24 h (Spuren 1-8) bzw. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen wie unter 4.4.2 beschrieben geerntet und lysiert. Zur Überprüfung der Proteingleichgewichtsmengen wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (50 µg) mittels 10%iger (E1B, p53, und Mre11) oder 12%iger (E4orf6) SDS-Gele aufgetrennt, durch Western Blot auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen E1B-55K (2A6), p53 (FL393), Mre11 oder E4orf6 (1807) inkubiert.

Mit Ausnahme von E1B-BC1 waren alle anderen Mutanten in der Lage die Gleichgewichtsmengen von transient exprimiertem p53 in Kombination mit E4orf6 zu reduzieren (Abb. 25, Spuren 1-8). Im Unterschied dazu wurde keine Abnahme von endogenem Mre11 in pE1B-BC1- und pE1B-RF6-transfizierten H1299-Zellen beobachtet (Abb. 25, Spuren 11 und 13). Dieser Befund steht im Einklang mit der Annahme, dass die vermeintliche RING-Fingerdomäne von E1B-55K spezifisch die Wechselwirkung mit Mre11 reguliert und unterstützt die Hypothese, dass E1B-55K im Abbauvorgang als Substraterkennungseinheit operiert. Schließlich zeigen diese Daten auch, dass die Inhibition des nukleären Exports von E1B-55K keinen Einfluss auf diese post-translationalen Funktionen hat, da die Gleichgewichtsmengen von p53 und Mre11 in pE1B-NES-transfizierten Zellen (Abb. 25, Spuren 6 und 14) reduziert sind.

5.2.10 Mutationen in der RING-Fingerdomäne verändern den transformierten Zellphänotyp

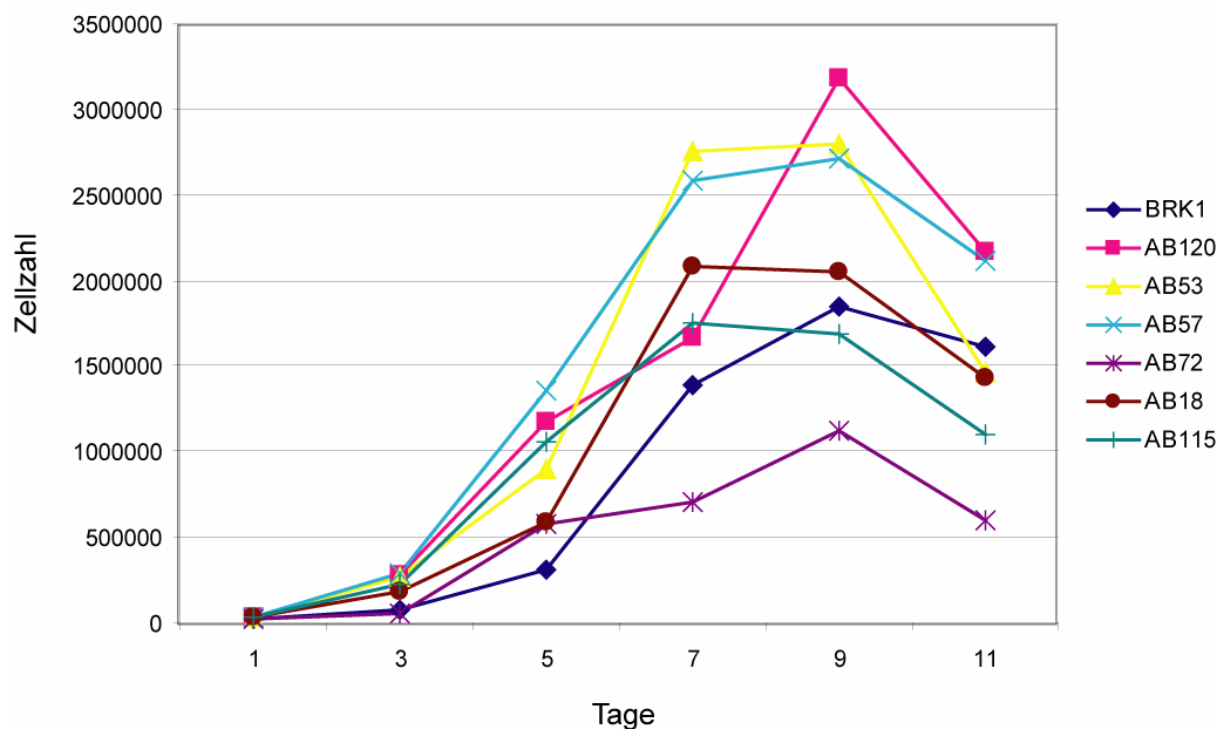
Die neoplastische Transformation primärer BRK-Zellen durch Ad5 E1A/E1B umfasst tief greifende Veränderungen verschiedenster zellulärer Regulationsmechanismen, die für die Initiation und Aufrechterhaltung eines vollständig transformierten Phänotyps notwendig sind. Viele dieser Prozesse konnten in den vergangenen Jahren identifiziert und im Hinblick auf seine Komponenten und deren biochemische Funktion aufgeklärt werden. Hierzu zählen insbesondere Veränderungen zellulärer Parameter, welche die Morphologie und das Wachstumsverhalten der Zellen betreffen. E1A/E1B-transformierte BRK-Zellen ändern häufig ihr epitheloides Aussehen und nehmen überwiegend eine kugelähnliche Gestalt an. Unterschiede bezüglich des Wachstumsverhaltens sind E1B-55K-abhängig und äußern sich in gesteigerten Proliferationsraten, höheren Sättigungsdichten, verminderter Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren und reduzierter Kontaktinhibition. Auf molekularer Ebene basieren die mikroskopisch sichtbaren Veränderungen vor allem auf neuen Eigenschaften der Zellzykluskontrolle, des Zytoskeletts, der Zelloberfläche und der extrazellulären Matrix.

5.2.10.1 Einfluss auf die Zellteilungsraten

Die im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen deuteten bereits auf unterschiedliche Effekte der E1B-Mutanten hinsichtlich der Zellproliferation und Morphologie hin. Deshalb wurden vergleichende Analysen zum Wachstum der Zellklone unter reduzierter Serumkonzentration (5% FKS) durchgeführt (Abb. 26 A). Dabei zeigte sich, dass die eingeführten Aminosäureaustausche in der BC-Box, dem NES und der RING-Fingerdomäne die Zellteilungsraten unterschiedlich beeinflussen. Der stärkste negative Effekt wurde bei AB72-Zellen beobachtet. Während AB120-Zellen Verdopplungszeiten von ca. 50 h aufwiesen, wurden bei AB72-Zellen Zellteilungszeiten von 90 h und Wachstum zu wesentlich geringeren Zelldichten beobachtet. Diese Unterschiede sind dabei nicht auf veränderte Gleichgewichtsmengen der stark mitogenen E1A-Proteine zurückzuführen (Abb. 26 B), da

insbesondere AB72-Zellen annähernd gleiche Mengen an E1A enthalten wie AB120-Zellen (Abb. 26 B, Spuren 2 und 5).

A



B

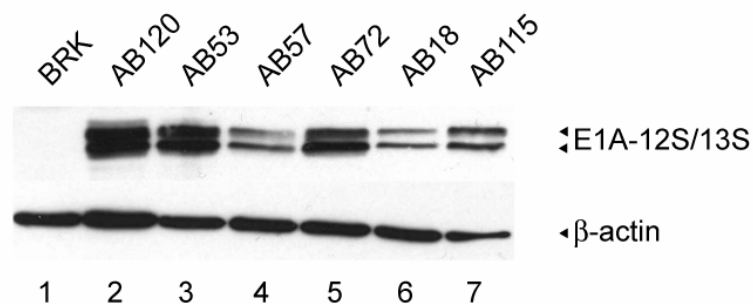


Abb. 26 Wachstumsverhalten der BRK-Zelllinien

(A) Pro Zelllinie (BRK1, AB120: E1B-55K; AB53: E1B-BC1; AB57: E1B-BC3; AB72: E1B-RF6; AB18 und AB115: E1B-NES) wurden jeweils 3×10^4 Zellen in sechs Vertiefungen einer 6-well Schale (Falcon) ausgesät und ein, drei, fünf, sieben, neun und elf Tage nach Aussaat die Anzahl der lebenden Zellen mittels Neubauer-Zählkammer (4.2.2) bestimmt. Die Zählungen wurden jeweils als Doppelwerte durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen. (B) Subkonfluente BRK- (Spur 1), AB120- (E1B-55K; Spur 2), AB53- (E1B-BC1; Spur 3), AB57- (E1B-BC3; Spur 4), AB72- (E1B-RF6; Spur 5), AB18- (E1B-NES; Spur 6) und AB115-Zellen (E1B-NES; Spur 7) wurden geerntet und wie unter 4.4.2 beschrieben lysiert. Es wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (50 μg für E1A und 20 μg für β -actin) mittels 10%igen SDS-Gelen aufgetrennt, durch *Western Blot* auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen E1A (M73) oder β -actin (AC-15) als Ladekontrolle inkubiert.

5.2.10.2 Einfluss auf das Zytoskelett

Schon seit längerer Zeit ist bekannt, dass die E1A/E1B-vermittelte Transformation bei hohen Sättigungsdichten der Zellen die Spaltung des Intermediärfilaments Vimentin verändert (Ben-Ze'ev *et al.*, 1986). Zudem gibt es neue Hinweise, dass es sich bei dem E1B-55K/p53-positiven perinukleären Proteinkomplex um eine Aggresomenstruktur handelt, dessen typisches Merkmal eine Ummantelung aus Vimentinfilamenten ist (Liu *et al.*, 2005). Aufgrund der in den Immunfluoreszenzanalysen erzielten Beobachtung, dass in AB72-Zellen die Integrität und Zahl dieser Strukturen deutlich verändert sind (Abb. 20-21), wurde die zytoplasmatische Verteilung von Vimentin relativ zu E1B-55K in BRK1-, AB120- und AB72-Zellen untersucht (Abb. 27).

Die Immunfärbung mit E1B-55K- (α -E1B) und Vimentin-spezifischen (α -Vimentin) Antikörpern ergab, dass Vimentin in BRK1-Zellen filamentös um den Zellkern und im Zytoplasma verteilt ist (Abb. 27, a-c). Zusätzlich wurde in AB120-Zellen die beschriebene Vimentinumhüllung des perinukleären Proteinkomplexes beobachtet (Abb. 27, d-f). Dagegen wiesen AB72-Zellen ein deutlich anderes Verteilungsmuster für Vimentin und E1B-55K auf. In 90% dieser Zellen wurde keine filamentöse Verteilung von Vimentin beobachtet (Abb. 27, g-i). Stattdessen war das Intermediärfilament vollständig um die zytoplasmatischen E1B-55K-positiven Proteinkomplexe konzentriert. In 10% der AB72-Zellpopulation wurden sehr kurze Vimentinfilamente beobachtet, die aber im Gegensatz zu BRK1- oder AB120-Zellen kein vollständiges zytoplasmatisches Netzwerk bildeten (Abb. 27, j-l).

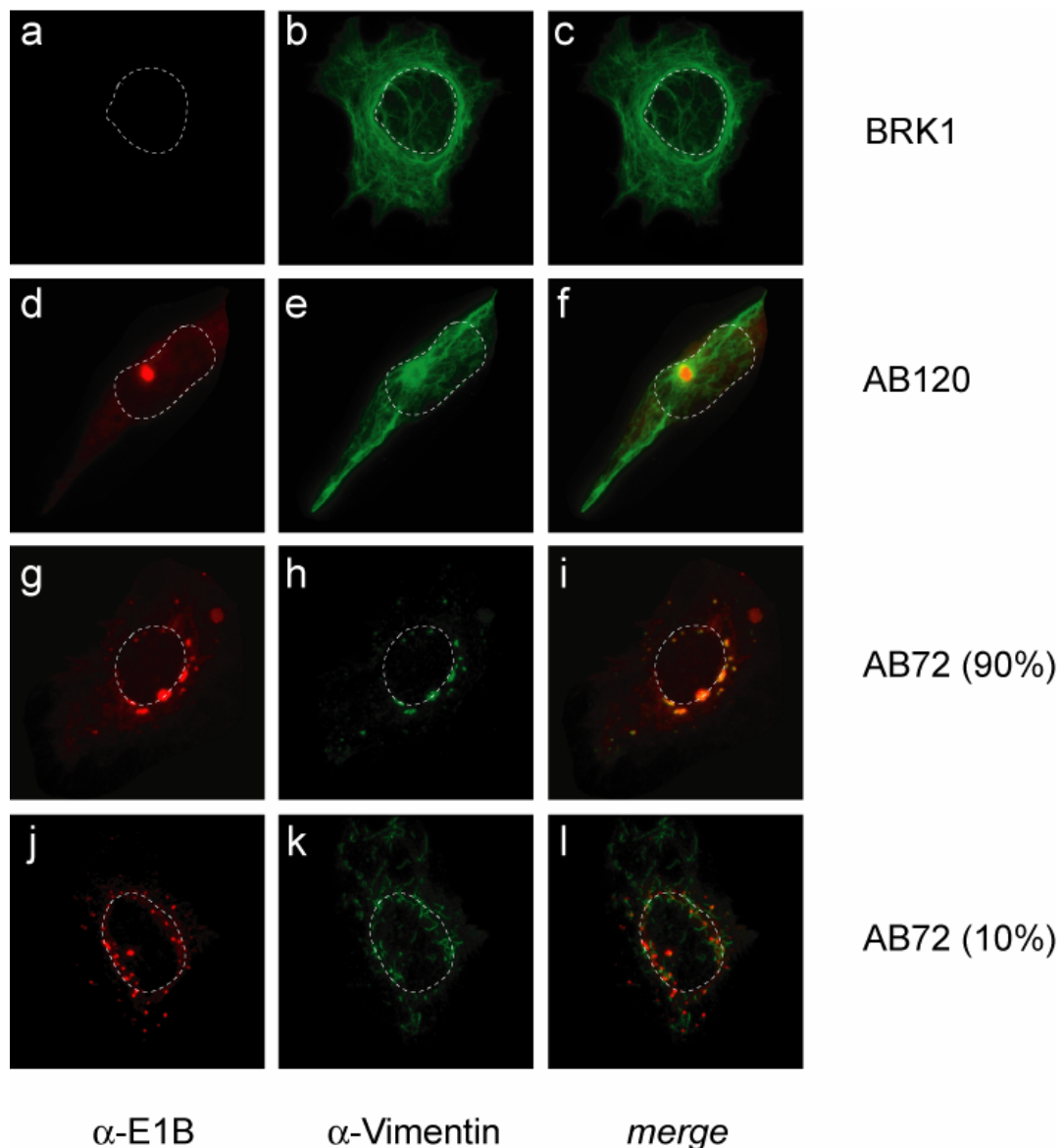


Abb. 27 Lokalisation von Vimentin und E1B-55K in BRK-Zelllinien

BRK1- (a-c), AB120- (E1B-55K; d-f), und AB72-Zellen (E1B-RF6; g-l) wurden *in situ* mit den anti-E1B-Antikörper 7C11 aus Ratte und anti-Vimentin-Antikörper aus Maus doppelmarkiert. Diese wurden wiederum mit den anti-Ratte-Texasrot- oder den anti-Maus-FITC-gekoppelten Sekundärintikörpern detektiert. Die Überlagerungen (*merge*) der Lokalisationen von E1B (rot; a, d, g, j) und Vimentin (grün; b, e, h, k) sind in c, f, i und l dargestellt. Die gestrichelten Linien in jedem Bild geben jeweils die Lage und Größe des Zellkerns an. Vergrößerung x 7600.

Zudem fiel bei den parallel durchgeführten Kernfärbungen der AB72-Zellen mit dem Farbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2'-Phenylindol Dihydrochlorid) auf, dass die AB72-Zellpopulation eine ungewöhnlich große Zahl multinukleärer Zellen (mehrere Zellkerne mit einem gemeinsamen Zytoplasma) aufwies (Abb. 28).

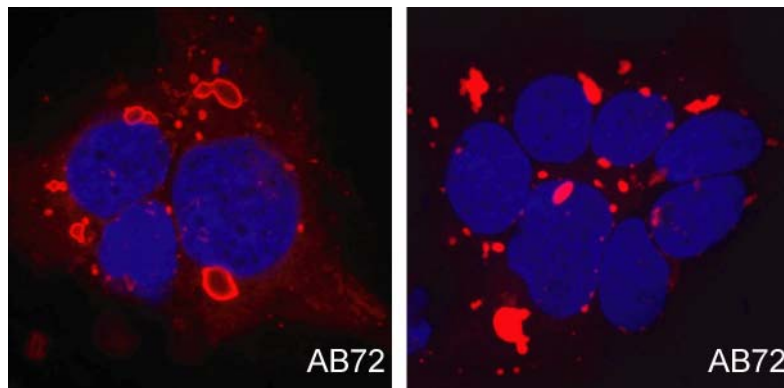


Abb. 28 Die E1A/E1B-RF6-transformierte Zelllinie AB72 hat einen hohen Anteil an multi-nukleären Zellen

AB72-Zellen (E1B-RF6) wurden *in situ* mit dem anti-E1B-Antikörper 2A6 aus Maus markiert. Dieser wurde wiederum mit dem anti-Maus-Texasrot-Sekundärantikörper detektiert. Zur Markierung der Zellkerne wurden die Zellen mit dem Farbstoff DAPI inkubiert und die Überlagerungen der Lokalisationen von E1B (rot) und dem Zellkern (blau) dargestellt. Vergrößerung x 7600.

Die Anwesenheit mehrerer Zellkerne in einem gemeinsamen Zytoplasma deutet darauf hin, dass die RING-Fingerdomäne in E1B-55K einen noch unbekanntem Vorgang im Zellzyklus reguliert, der durch die C454S/C456S-Substitutionen zumindest teilweise blockiert wird. Dabei könnte es sich um den G2/M-Phasenübergang und/oder den Zellteilungsprozess (Mitose) handeln. Veränderungen in diesen Zellzyklusphasen resultieren häufig in einer Endoreplikation, d. h. Verdopplung der Chromosomen in der S-Phase ohne anschließende Zellteilung in der M-Phase. Demzufolge könnte der Vorgang der Endoreplikation auch mit der reduzierten Focus-Bildung der E1B-RF6-Mutante (Abb. 15) und den verringerten Teilungsraten von AB72-Zellen in Verbindung stehen (Abb. 26). Welche Rolle dabei die Interaktion mit Mre11, die Umverteilung von PML-NBs und die Ausbildung zytoplasmatischer Proteinaggregate spielt, müssen weiterführende funktionelle Untersuchungen zeigen.

6.1 Adenovirus-vermittelte Transformation

Die onkogene Transformation primärer Zellen durch humane Adenoviren ist ein mehrstufiger Prozess, der durch das kooperative Zusammenwirken mehrerer Genprodukte der Transkriptionseinheiten E1A und E1B gesteuert wird. Dabei vermitteln die E1A-Genprodukte den entscheidenden Schritt der Zelltransformation (zur Übersicht: Endter und Dobner, 2004). Klassische Transformationsversuche auf der Basis primärer BRK-Zellen zeigen, dass die Expression von E1A alleine für die Immortalisierung und partielle Zelltransformation ausreichend ist (Haley *et al.*, 1984; Moran *et al.*, 1986). Die immortalisierenden Eigenschaften von E1A in nicht-permissiven Zellen beruhen dabei auf der Fähigkeit das normale Zellwachstum zu deregulieren. E1A stimuliert den Eintritt der Zellen in die S-Phase, um im produktiven Infektionsverlauf Adenovirus-infizierter Zellen optimale Bedingungen in nicht-proliferierenden Zellen zu schaffen. Außerdem moduliert E1A die Funktionen von Schlüsselenzymen, die an der Zellzykluskontrolle, dem programmierten Zelltod (Apoptose) und am Proteinumsatz beteiligt sind (zur Übersicht: Gallimore und Turnell, 2001). Die Folgen davon sind die Induktion einer außerplanmäßigen DNA-Synthese und Zellproliferation durch E1A, so dass primäre Zellen mit einer begrenzten Lebenszeit immortal werden und den Mechanismen der Seneszenz entkommen (Moran, 1994; Shenk, 2001). Im Falle einer abortiven Infektion in nicht-permissiven Nagerzellen hingegen können diese wachstumsderegulierenden Funktionen zur Immortalisierung und Zelltransformation führen.

Paradoxerweise stimulieren die transformationsfördernden Aktivitäten von E1A aber gleichzeitig auch die Apoptose und den Wachstumsstopp der transformierten Zellen und verringern damit die transformierenden Eigenschaften von E1A. Diese antiproliferativen Aktivitäten beruhen auf der E1A-induzierten Stabilisierung des Tumorsuppressorproteins p53 (Debbas und White, 1993; Lowe und Ruley, 1993; Grand *et al.*, 1994; Sabbatini *et al.*, 1995). Zusätzlich kommt es zur Inhibition des

Proteasomen-vermittelten Abbaus von p53 (Turnell *et al.*, 2000). Aus diesen Gründen kann die Mehrzahl der E1A-immortalisierten Zellen zwar dauerhaft subkultiviert werden, die Transformation ist aber unvollständig. Dies zeigt sich darin, dass die Transformanten in Zellkultur nicht zu hohen Zelldichten heranwachsen und im Tiermodell nur schwach tumorigen sind (Gallimore *et al.*, 1984). Für eine vollständige Etablierung des transformierten Phänotyps ist deshalb die Koexpression der E1B-Genprodukte oder anderer kooperierender Onkoproteine wie z. B. aktiviertem Ha-ras (Ruley, 1983) nötig, die den E1A-induzierten antiproliferativen Mechanismen entgegenwirken.

Obwohl die E1B-Proteine alleine kein transformierendes Potenzial besitzen, steigern sie in Kooperation mit E1A die Transformationshäufigkeit drastisch und führen zu einem vollständig transformierten Phänotyp. Dem klassischen Modell zufolge korreliert die transformationsfördernde Wirkung von E1B-55K dabei mit seiner Fähigkeit, den Tumorsuppressor p53 zu binden und die Transkription p53-abhängiger Promotoren zu reprimieren (Sarnow *et al.*, 1984; Yew und Berk, 1992; Yew *et al.*, 1994). Gleichzeitig wird p53 aus dem Zellkern in ein zytoplasmatisches perinukleäres Proteinaggregat sequestriert (Zantema *et al.*, 1985b; Blair-Zajdel und Blair, 1988) und führt so zu einer räumlichen Umverteilung und möglicherweise Inaktivierung des Tumorsuppressorproteins. Es wurde deshalb angenommen, dass beide E1B-abhängigen Funktionen der p53-induzierten Apoptose (Teodoro und Branton, 1997; Sabbatini *et al.*, 1995) und/oder dem p53-stimulierten Zellzyklusarrest (Shepherd *et al.*, 1993; Hutton *et al.*, 2000) synergistisch entgegenwirken.

Die Rolle und der molekulare Mechanismus der zytoplasmatischen Restriktion von p53 durch E1B-55K ist noch immer unklar. Es konnte jedoch kürzlich gezeigt werden, dass Ad5 E1B-55K eine intrinsische nukleozytoplasmatische Pendelaktivität besitzt, die unabhängig von p53 und mdm2 ist (Krätzer *et al.*, 2000; Dosch *et al.*, 2001). Genetische und biochemische Daten zeigen, dass der nukleäre Export von E1B-55K durch den zellulären Exportrezeptor CRM1 vermittelt wird, der an ein Leucinreiches NES im N-terminalen Bereich des viralen Proteins bindet (Krätzer *et al.*, 2000;

Endter *et al.*, 2001; Dosch *et al.*, 2001). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass der CRM1-vermittelte Kernexport von E1B-55K einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von p53 haben könnte. Folglich könnte ein aktiver nukleärer Export des viralen Proteins auch ein wichtiger Mechanismus sein über den E1B-55K die antiproliferativen Eigenschaften von p53 neutralisiert und auf diese Weise zur vollständigen Transformation in Kooperation mit E1A beiträgt.

Die Bereiche in E1B-55K, die für die transformierenden Eigenschaften des Proteins notwendig sind, lokalisieren in verschiedenen Abschnitten des Ad5-Polypeptids. Sie umfassen das SUMO1-Konjugationsmotiv (SKM, ΨKXE) an Aminosäureposition 104 (Endter *et al.*, 2001), die p53-Interaktionsdomäne im zentralen Bereich (Yew *et al.*, 1990; Yew und Berk, 1992; Grand *et al.*, 1999), sowie zwei Regionen am C-terminalen Ende, die die Inhibition der p53-abhängigen und p53-unabhängigen Transaktivierung vermitteln (Yew *et al.*, 1994; Teodoro *et al.*, 1994; Teodoro und Branton, 1997). Neue Ergebnisse unserer und anderer Arbeitsgruppen weisen außerdem darauf hin, dass E1B-55K im Transformationsvorgang eine Vielzahl von weiteren Wechselwirkungen mit zellulären Proteinen eingeht und andere, bisher nicht bekannte Funktionen bereitstellt, die zur Zelltransformation beitragen könnten.

6.2 Die Rolle des nukleären Exports bei der Transformation

6.2.1 Der CRM1-vermittelte Kernexport von E1B-55K ist nicht notwendig für die Transformation und die Inhibition der p53-Transaktivierung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle des CRM1-vermittelten Kernexports von Ad5 E1B-55K in der E1A/E1B-induzierten Transformation primärer BRK-Zellen untersucht. Zuerst konnte gezeigt werden, dass E1B-55K auch in primären BRK-Zellen CRM1-abhängig zwischen Zytoplasma und Kern pendelt (Abb. 6; Endter *et al.*, 2005). Die durchgeführten Transformationsversuche zeigen, dass eine Exportdefiziente E1B-55K-Mutante die *Focus*-Bildung von primären BRK-Zellen im

Vergleich zum Wildtypprotein in Kooperation mit E1A wesentlich erhöht (Abb. 7; Endter *et al.*, 2005). In transienten Reporter-genversuchen korreliert diese Funktionssteigerung ebenfalls mit einer verstärkten Inhibition der p53-stimulierten Transkription (Abb. 8; Endter *et al.*, 2005). Daraus lässt sich schließen, dass der CRM1-vermittelte nukleäre Export von E1B-55K weder für die kooperative Transformation mit E1A noch für die Bindung an p53 und die Inhibition der p53-Transaktivierung notwendig ist. Stattdessen hat die intrinsische Kernexportfunktion des E1B-Proteins einen negativen Effekt auf die transformierenden Eigenschaften in Kooperation mit E1A und die Inhibition der p53-stimulierten Transkription. Diese Ergebnisse sind unerwartet und stehen im Widerspruch zu der Annahme, dass die Verringerung von nukleärem p53 durch einen aktiven E1B-55K-vermittelten Kernexport für die Inaktivierung des Tumorsuppressorproteins und die vollständige Transformation wichtig ist.

6.2.2 Die Inhibition des Kernexports von E1B-55K führt zur Sequestrierung von PML-NBs

Seit einigen Jahren ist es die anerkannte wissenschaftliche Meinung, dass PML ein zentraler Vermittler der p53-induzierten Apoptose und des p53-stimulierten Zellzyklusarrests ist, da es mit dem Tumorsuppressorprotein im Kontext von PML-NBs interagiert (zur Übersicht: Hofmann und Will, 2003). Viele Ergebnisse deuten mittlerweile darauf hin, dass diese Funktion die direkte Bindung an p53 und die Lokalisation der beiden Proteine in den PML-NBs beinhaltet. In Anbetracht der zentralen Rolle von PML und den PML-NBs in der Regulation p53-abhängiger Prozesse, ist es auffallend, dass die E1B-NES-Mutante die Bildung von distinkten nukleären Aggregaten erzeugt, die sowohl p53 als auch PML enthalten (Abb. 9+10; Endter *et al.*, 2005). Tatsächlich wird dabei nukleäres p53 und PML in den E1A/E1B-NES-transformierten AB18- und AB115-Zellen in wenige distinkte Aggregate vollständig sequestriert. Diese Proteinkomplexe entsprechen den durch das E1B-NES-Protein gebildeten nukleären Strukturen und zeigen eine nahezu perfekte

Überlagerung. Interessanterweise handelt es sich bei den PML-Aggregaten im Unterschied zu p53 oder E1B-55K nicht um eine große globuläre Struktur, sondern um mehrere kleinere Proteinaggregate, die an der Peripherie der E1B-55K/p53-Komplexe lokalisieren (Abb. 11). Außerdem kann nach Blockierung des nukleären Exports von E1B-55K auch eine Kolo-kalisation mit einer weiteren PML-NB-Komponente daxx beobachtet werden (Abb. 12). Die Tatsache, dass die E1B-NES-Mutante stärker mit daxx wechselwirkt als das Wildtypprotein, könnte dabei einen direkten Zusammenhang zur gesteigerten Transformationsfähigkeit herstellen (Abb. 22).

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass durch die Blockierung des CRM1-vermittelten Kernexports von E1B-55K nicht nur das PML-NB-Markerprotein PML, sondern der komplette PML-NB-Komplex sequestriert und so möglicherweise vollständig inaktiviert wird. Folglich könnten die beobachteten positiven Effekte der E1B-NES Mutante bei der *Focus*-Bildung, der Inhibition der p53-Transaktivierung und dem Tumorwachstum in Nacktmäusen mit der Umverteilung von PML, daxx und p53 in inaktive PML-NBs gekoppelt sein (Wang *et al.*, 2004). Konsistent mit diesem Modell konnte für Ad2 E1B-55K gezeigt werden, dass es ebenfalls direkt mit der PML-NB-Komponente daxx interagiert und mit p53 und PML in nukleären Aggregaten kolo-kalisiert, die sich in diesem Fall aber von PML-NBs unterscheiden. Als Folge dieser Wechselwirkung wird die p53-stimulierte Transkription durch daxx inhibiert (Zhao *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Beobachtungen kann postuliert werden, dass die transformierenden Eigenschaften von Ad2/5 E1B-55K neben der Modulation von p53, auch über PML, daxx und möglicherweise andere PML-NB-assoziierte Proteine vermittelt werden. Dementsprechend beeinflussen auch Mutationen im NES von E1B-55K die *Focus*-Bildung, da sie die Menge an nukleärem E1B-55K dramatisch erhöhen, die Kolo-kalisation mit den PML-NBs verstärken, die Wechselwirkungen mit und Modulationen von PML-NB-assoziierten Proteinen steigern und dadurch die Transformationshäufigkeit in Kooperation mit E1A erhöhen.

Falls hohe Mengen an nukleärem E1B-55K die Funktionen von p53, PML und daxx tatsächlich effizienter inaktivieren, ist es sehr wahrscheinlich, dass die beobachteten Unterschiede bezüglich der Onkogenität zwischen AB120- und AB18/115-Zellen (Tab. 3; Endter *et al.*, 2005) ebenfalls in direktem Zusammenhang mit dem Phänotyp der E1B-NES-Mutante stehen. Dieses Modell würde mit der Beobachtung übereinstimmen, dass während des Tumorwachstums in den Nacktmäusen keine Selektion gegen die nukleären E1B/p53-haltigen Kernaggregate stattfindet (Abb. 13; Endter *et al.*, 2005). Außerdem korreliert dies auch mit der früheren Beobachtung, dass transformierte Rattenzellen, die Ad5 E4orf3 und/oder E4orf6 exprimieren, ein gesteigertes onkogenes Potenzial in Nacktmäusen aufweisen (Nevels *et al.*, 1999a; Nevels *et al.*, 1999b), da beide E4-Proteine den nukleären Export von E1B-55K negativ beeinflussen (Goodrum *et al.*, 1996; Moore *et al.*, 1996; König *et al.*, 1999; Leppard und Everett, 1999; Lethbridge *et al.*, 2003). Ebenfalls konsistent mit dieser Überlegung ist die Beobachtung, dass das E1B-54K-Protein des hoch onkogenen Ad12 Funktionen hat, die die Tumorigenität der Ad5 E1A/E1B-transformierter Zellen in Nacktmäusen erhöhen, wenn beide E1B-Proteine gegeneinander ausgetauscht werden (Bernards und Van der Eb, 1984). Dabei zeigt Ad12 E1B-54K eine ausschließlich nukleäre Lokalisation in Ad12-transformierten Zellen, was vermutlich durch das Fehlen eines intakten NES zustande kommt (Krätzer *et al.*, 2000). Infolgedessen könnte der kontinuierliche Kernexport von Ad5 E1B-55K eine negative Rolle bei der Onkogenität der Ad5 E1A/E1B-transformierten Zellen spielen.

6.2.3 Die zytoplasmatische Sequestration von p53 ist unabhängig vom CRM1-vermittelten Kernexport von E1B-55K

Obwohl E1B/p53-haltige zytoplasmatische Proteinaggregate ein Charakteristikum der Subgruppe C Ad2/5-transformierten Zellen sind, ist deren Rolle in der Zelltransformation immer noch unklar. Genetische Analysen mit verschiedenen Ad2/5-Mutanten weisen darauf hin, dass wahrscheinlich kein direkter Zusammenhang zwischen der zytoplasmatischen Sequestration und der Zelltransformation besteht

(Yew und Berk, 1992; Yew *et al.*, 1994; Teodoro *et al.*, 1994; Martin und Berk, 1998; Endter *et al.*, 2001). Dafür spricht auch die Tatsache, dass Ad12 E1B-54K analog zu Ad2/5 E1B-55K die transkriptionsstimulierenden Eigenschaften von p53 inhibiert (Yew und Berk, 1992; Zhao und Liao, 2003), obwohl das Ad12-Protein den Tumorsuppressor in stabil-transformierten Nagerzellen nicht in zytoplasmatische Aggregate sequestriert (Zantema *et al.*, 1985b). Dagegen zeigen neuere Untersuchungen, dass die Überexpression von Ad12 E1B-54K durchaus die Bildung von p53/E1B-haltigen Proteinaggregaten im Zytoplasma induziert (Wienzek *et al.*, 2000; Zhao und Liao, 2003), wodurch möglicherweise die p53-regulierte Induktion der Apoptose in Mitochondrien inhibiert wird (Zhao und Liao, 2003). Aufgrund dieser Beobachtungen kann über die Bedeutung der CRM1-abhängigen Kernexportfunktion des E1B-55K-Proteins für die Ausbildung der p53/E1B-55K-haltigen zytoplasmatischen Proteinkomplexe momentan nur spekuliert werden.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse weisen darauf hin, dass dieser Prozess unabhängig vom Kerntransport erfolgt, da AB18- und AB115-Zellen und auch LMB-behandelte AB120-Zellen konsistent diese Strukturen enthalten (Abb. 9; Endter *et al.*, 2005). Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass diese Komplexe unlöslichen zytoplasmatischen Proteinaggregaten entsprechen, die post-translational infolge großer, physiologisch nicht-tolerierbarer Proteinmengen ausgebildet werden (Zantema *et al.*, 1985a; Blair-Zajdel und Blair, 1988; van den Heuvel *et al.*, 1990), und damit für die zellulären Komponenten der Kernimportmaschinerie unzugänglich sind. In diesem Zusammenhang wurde kürzlich gezeigt, dass die p53/E1B-haltigen Proteinkomplexe tatsächlich typische Eigenschaften von Aggresomen aufweisen (Abb. 27; Liu *et al.*, 2005), die bekanntermaßen den Abbau von überschüssigen, fehlgefalteten oder funktionell inaktiven Proteinen im Zytoplasma vermitteln (zur Übersicht: Kopito, 2000; Gordon, 2002).

Zusammenfassend konnte im ersten Teil dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Inhibition des CRM1-vermittelten nukleären Exports von E1B-55K die onkogene Transformation von primären BRK-Zellen steigert. Diese Funktionssteigerung

beinhaltet kombinatorische Effekte, die p53 und wahrscheinlich auch PML und daxx modulieren. Außerdem unterstützen diese Ergebnisse die Annahme, dass die Inhibition von PML-Funktionen durch E1B-55K für die effiziente *Focus*-Bildung notwendig ist (Nevels *et al.*, 1999b; Endter *et al.*, 2001).

6.3 Der Einfluss der BC-Box und RING-Fingerdomäne auf das transformierende Potenzial von E1B-55K

In weiterführenden Arbeiten wurden die Funktionen des adenoviralen E1B-55K-Polypeptides im Transformationsprozess weiter charakterisiert und der Einfluss verschiedener Proteinbereiche untersucht, die für das transformierende Potenzial des viralen Polypeptids wichtig sein könnten. In diesem Zusammenhang konnte in vorausgehenden Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Ad5 E1B-55K zwei Sequenzmotive besitzt, die große Übereinstimmungen mit sog. BC-Boxen bzw. RING-Fingerdomänen aufweisen (Zeller, 2004). Beide Motive sind in den großen E1B-Proteinen humaner Serotypen konserviert und die Proteininteraktionsmodule könnten somit an den transformierenden Funktionen von E1B-55K beteiligt sein. Das hoch konservierte BC-Box-Motiv mit der Konsensussequenz [A,P,S,T]LXXXCXXX[A,I,L,V] vermittelt die Bindung von Elongin B und C und ist in einer Reihe von Proteinen einschließlich dem *von-Hippel-Lindau*-Tumorsuppressor-komplex (VHL) enthalten (zur Übersicht: Kamura *et al.*, 1998; Kamura *et al.*, 2001; Kamura *et al.*, 2004). Der VHL-Komplex fungiert als E3-UbiquitinLigase und ist für den proteasomalen Abbau bestimmter Zielproteine (z. B. HIF1 und HIF2) verantwortlich (Duan *et al.*, 2001; Kibel *et al.*, 1995; Maxwell *et al.*, 1999; Cockman *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2000; Ohh *et al.*, 2000).

RING-Fingerdomänen repräsentieren Zink-bindende Bereiche, die durch eine definierte Anordnung von Cystein- und Histidinresten gekennzeichnet sind und über die Bindung von zwei Zink-Atomen räumlich koordiniert werden (zur Übersicht: Matthews und Sunde, 2002). Soweit bekannt steuern RING-Finger-

domänen Protein-Proteinwechselwirkungen und spielen eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie der Ubiquitylierung oder Sumoylierung und dem Replikationszyklus verschiedener RNA- und DNA-Viren (zur Übersicht: Saurin *et al.*, 1996; Borden, 2000; Jackson *et al.*, 2000; Joazeiro und Weissman, 2000; Pichler *et al.*, 2002). Obwohl keine der klassischen RING-Finger-Konsensussequenzen genau mit den Motiven in E1B-55K übereinstimmen, liegt die Vermutung nahe, dass das virale Protein tatsächlich eine RING-Fingerdomäne enthält, zumal die beschriebenen Motive eine hohe Variabilität zeigen und E1B-55K in der Lage ist *in vitro* Zink zu binden (Roger Grand, persönliche Mitteilung). Außerdem weisen erste Mutationsanalysen darauf hin, dass definierte Aminosäureaustausche in der RING-Finger-Domäne, aber auch der BC-Box die transformationsrelevanten Eigenschaften von E1B-55K beeinflussen (Zeller, 2004). Von besonderem Interesse war hierbei die Beobachtung, dass die RING-Fingerdomäne wahrscheinlich ein wichtiges Strukturelement des viralen Proteins darstellt und möglicherweise über einen noch unbekanntem Mechanismus zur vollständigen Zelltransformation beiträgt.

6.3.1 Die transformierenden Eigenschaften von E1B-55K umfassen p53-abhängige und p53-unabhängige Funktionen

Die Transformationsversuche mit primären BRK-Zellen zeigen, dass E1B-55K und E1B-BC3 die *Focus*-Bildung von E1A verstärken, während die Zahl der Transformanten in Gegenwart von E1B-BC1 und E1B-RF6 deutlich reduziert ist (Abb. 15). Die Inaktivierung des zellulären Tumorsuppressorproteins p53 ist ein wichtiger Mechanismus über den Onkoproteine verschiedener Tumoviren die Zelltransformation und Tumorbildung induzieren. Auch das transformierende Potenzial von Ad5 E1B-55K wurde bisher überwiegend der Bindung und Inhibition von p53 zugeordnet. Die dafür erforderlichen Domänen lokalisieren im zentralen p53-Bindebereich des viralen Polypeptids und am C-Terminus, der die Inhibition der p53-abhängigen und -unabhängigen Transkriptionsaktivierung vermittelt. Für beide Regionen ist bekannt, dass sie sowohl für die transkriptionshemmenden und damit

verbunden auch für die transformationsstimulierenden Eigenschaften des Proteins essentiell sind (Teodoro *et al.*, 1994; Teodoro und Branton, 1997). Aus diesen Gründen wurde überprüft, ob die eingeführten Mutationen einen Einfluss auf die Inhibition der p53-abhängigen (Abb. 16-17) und -unabhängigen Transkription haben (Abb. 19). Während E1B-55K, E1B-BC3 und E1B-RF6 in der Lage sind sowohl die p53-vermittelte als auch die p53-unabhängige Transkription fast vollständig zu inhibieren, war die Fähigkeit der Mutante E1B-BC1 in beiden Versuchsansätzen stark reduziert (Abb. 16-19).

Im Gegensatz dazu ist die Mutante E1B-BC1 (L180P/C184F) deutlich in ihrer Fähigkeit eingeschränkt, in Kooperation mit E1A die Transformationseffizienz zu stimulieren. Diese Verringerung des transformierenden Potenzials stimmt mit der verminderten Repression p53-abhängiger und -unabhängiger Promotoren überein (Abb. 16-19). Die Untersuchung der Gleichgewichtsmengen von E1B-BC1 zeigt jedoch eine drastisch verminderte Proteinmenge im Vergleich zum Wildtypprotein (Abb. 18). Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Aminosäureaustausch ein weitgehend instabiles und deshalb stark in seinen Funktionen eingeschränktes Protein hervorruft. Die verminderte Transformationseffizienz und die Unfähigkeit die p53-stimulierte Transkription zu inhibieren kann deshalb durch die stark reduzierten Gleichgewichtsmengen der E1B-BC1-Mutante erklärt werden und folgt dem klassischen Modell, dass die Transformations-stimulierenden Eigenschaften von E1B-55K durch die Repression der p53-abhängigen und -unabhängigen Transkription vermittelt werden.

Einen hoch interessanten Phänotyp zeigt die Mutante E1B-RF6. Obwohl die Mutante die Transaktivierung p53-abhängiger (Abb. 16-17) und unabhängiger (Abb. 19) Promotoren reprimiert ist sie nicht mehr in der Lage die *Focus*-Bildung zu steigern (Abb. 15). Dieser Phänotyp kann daher nicht auf Veränderungen der p53-Interaktion und der intrinsischen Repressionaktivität beruhen. E1B-RF6 widerspricht damit erstmalig der Annahme, dass E1B-55K nur über seine p53-inaktivierende Wirkung zur vollständigen Transformation beiträgt.

6.3.2 Ad5 E1B-55K bindet in transformierten Zellen an Mre11 und verschiedene PML-Isoformen

In transient transfizierten und transformierten Zellen befindet sich das Gleichgewicht von E1B-55K aufgrund der effizienten Kernexportfunktion überwiegend auf der zytoplasmatischen Seite (Krätzer *et al.*, 2000). Vermutlich lokalisiert das virale Protein deshalb hauptsächlich im Zytoplasma und dort zusammen mit p53 primär in einem kernständigen dichten Proteinaggregat. Auch Mre11, eine zentrale Komponente des DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturkomplexes Mre11/Rad50/NBS1 (MRN-Komplex) wird aus dem Zellkern in das perinukleäre Proteinaggregat sequestriert (Abb. 24). Nach Inhibition des CRM1-vermittelten Kernexportweges, wird das virale Onkoprotein im Zellkern zurückgehalten und akkumuliert dort zusammen mit p53, PML, daxx und Mre11 in globulären Proteinaggregaten (Abb. 9-12; Abb. 21+24). Auffallend ist allerdings, dass im Gegensatz zu E1B-55K und p53, die nach der Inhibition des CRM1-vermittelten Kernexports noch immer im perinukleären Proteinkomplex lokalisieren, Mre11 dort nicht mehr beobachtet werden kann. Dies lässt die Vermutung zu, dass Mre11 eine eigenständige intrinsische CRM1-abhängige Exportfunktion besitzt. Dafür spricht die Tatsache, dass Mre11 zwei Bereiche enthält, die große Übereinstimmung zu Leucin-reichen NESs haben. Da aber auch in E1B-NES-Zellen kein Mre11 im perinukleären Proteinkomplex zu detektieren ist (Abb. 24), lässt sich daraus schließen, dass die Lokalisation von Mre11 dort abhängig vom CRM1-vermittelten Kernexport von E1B-55K ist und Mre11 oder der MRN-Komplex auf diese Weise effizient inaktiviert werden (Liu *et al.*, 2005).

Die Bindungsstudien dieser Arbeit zeigen außerdem erstmalig, dass E1B-55K in transformierten Zellen neben p53 und daxx auch mit Mre11 und verschiedenen PML-Isoformen interagiert (Abb. 22+23; Zantema *et al.*, 1985a; Zantema *et al.*, 1985b; Blair-Zajdel und Blair, 1988; Orlando und Ornelles, 1999). Außerdem ist auffällig, dass in den E1A/E1B-transformierten Zelllinien im Vergleich zu BRK-Zellen die Expression der verschiedenen PML-Isoformen stark erhöht ist (Abb. 22). Eine erhöhte Menge an funktionellem PML würde die Transformation supprimieren (Liu

et al., 1995). Deshalb führt die Bindung von E1B-55K an die verschiedenen PML-Isoformen führt deshalb vermutlich zur Inaktivierung des Tumorsuppressors. Dementsprechend ist zur vollständigen Transformation durch Ad5 E1B-55K die Interaktion mit und Modulation von PML bzw. der kompletten PML-NB-Strukturen notwendig ist, um die PML/p53-regulierten Apoptose Vorgänge zu inhibieren.

6.3.3 Mutationen in der BC-Box führen zu einem neutralen Phänotyp oder verringern stark die Stabilität von Ad5 E1B-55K

Die Untersuchung der subzellulären Lokalisation und die Analyse der Protein-Proteininteraktionen der Mutante E1B-BC3 zeigen (Abb. 20-24) wie schon in den Transformations- und Repressionsversuchen ein gleiches Verteilungsmuster wie das Wildtypprotein. Die Mutante lokalisiert ebenfalls zusammen mit p53 im perinukleären Kompartiment und akkumuliert nach der Blockierung des CRM1-vermittelten Kernexports zusammen mit p53, PML, daxx und Mre11 in kernständigen Proteinaggregaten (Abb. 21+24). Auch die Wechselwirkung mit diesen Proteinen ist durch die eingeführte Mutation nicht verändert (Abb. 22-23). Fasst man diese Beobachtungen zusammen, so fällt auf, dass die C184T-Substitution in E1B-BC3 zumindest für die hier getesteten Eigenschaften eine neutrale Mutation ist, da sie weder einen deutlichen Einfluss auf die transformierenden noch auf die transkriptionshemmenden Eigenschaften des viralen Proteins hat. Diese Beobachtungen stimmen mit Untersuchungen am *von-Hippel-Lindau*-Protein überein, bei dem durch Kristallstrukturanalysen die Bindung des Elongin BC-Komplexes an das BC-Box-Motiv auf die Interaktion mit dem Leucin an Position zwei kartiert wurde (Stebbins *et al.*, 1999). Falls es sich bei dem vorhandenen BC-Box Motiv tatsächlich um einen aktiven Strukturbereich handelt, hat die Mutation E1B-BC3 vermutlich keinen Einfluss auf dessen Funktionalität. Blanchette und Mitarbeiter haben mittlerweile festgestellt, dass es sich bei dem in E1B-55K vorkommenden BC-Box-Motiv trotz großer Übereinstimmung zur Konsensussequenz [A,P,S,T]LXXXCXXX[A,I,L,V] nicht um eine aktive Domäne handelt, die die

Wechselwirkung mit dem Elongin BC-Komplex vermittelt (Paola Blanchette, persönliche Mitteilung).

Wie die Ergebnisse mit E1B-NES im ersten Teil dieser Arbeit (Endter *et al.*, 2005) und auch Beobachtungen mit anderen E1B-Mutanten, wie z. B. E1B-K104R (Endter *et al.*, 2001), gezeigt haben, kann eine Veränderung des transformierenden Potenzials auch mit einer veränderten subzellulären Lokalisation einhergehen. Dies bestätigt sich mit der zweiten BC-Box-Mutante. E1B-BC1 besitzt im Gegensatz zum Wildtypprotein oder E1B-BC3 eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung. Sie ist im Gegensatz zum Wildtypprotein fast ausschließlich diffus im Zytoplasma verteilt und dementsprechend zeigt auch p53 eine E1B-unabhängige, diffuse Lokalisation im Zellkern (Abb. 20). Nur in ca. 1 % der Zellen lokalisiert E1B-BC3 zusammen mit p53 in einem perinukleären Proteinkomplex. Die LMB-Behandlung der E1B-BC1-transformierten Zellen führte zu keiner nukleären Akkumulation des Proteins zusammen mit p53, PML, daxx oder Mre11 (Abb. 21+24) und es kann auch keine Wechselwirkung mit diesen zellulären Proteinen nachgewiesen werden (Abb. 22-23). Demzufolge ist E1B-BC1 als eigentlicher Substratlieferant des Komplexes auch nicht mehr in der Lage, die Gleichgewichtsmengen von p53 und Mre11 in Kooperation mit Ad5 E4orf6 zu reduzieren (Abb. 25). Allerdings zeigt die Analyse der Gleichgewichtsproteinmengen dieser Mutante, dass auch in den transformierten Zellen E1B-BC1 nur in sehr geringen Mengen vorhanden ist, was auf eine stark verminderte Stabilität hinweist (Abb. 22). Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass durch die Einführung der Aminosäureaustausche ein überwiegend instabiles Polypeptid entsteht. Dadurch ist das Protein nicht mehr in der Lage die zur Stimulation der Transformation notwendigen Wechselwirkungen mit zellulären Proteinen einzugehen und ist daher stark in seinen Funktionen eingeschränkt.

6.3.4 Die Mutation in der RING-Fingerdomäne verändert die subzelluläre Verteilung von Ad5 E1B-55K

Die Lokalisation der Mutante E1B-RF6 ist im Vergleich zum Wildtypprotein stark verändert. Auch hier korreliert die Abweichung des transformierenden Potenzials mit einer veränderten subzellulären Lokalisation. Das virale Polypeptid lokalisiert zytoplasmatisch und kondensiert dort neben einer diffusen Verteilung zusammen mit p53 in zahlreichen Aggregaten, die nicht mehr die charakteristische Form und Lage des *perinuclear body* aufweisen, sondern über das gesamte Zytoplasma verteilt sind (Abb. 20). Die Blockierung des nukleären Exports von E1B-RF6 durch LMB resultiert zusätzlich in einer diffusen nukleären Verteilung, führt aber überraschenderweise nicht zur Bildung der globulären Kernaggregate (Abb. 21). Dennoch zeigen die Bindungsstudien, dass die eingeführten Aminosäureaustausche keinen Einfluss auf die Interaktion mit p53 oder PML und nur einen geringfügigen Einfluss auf die Wechselwirkung mit daxx haben (Abb. 22). Die Lokalisation von E1B-55K in den subnukleären Aggregaten wird somit nicht durch die Wechselwirkung mit diesen Proteinen induziert. Vielmehr weisen diese Beobachtungen darauf hin, dass das stark verringerte transformierende Potenzial der E1B-RF6-Mutante unabhängig von Interaktionen mit diesen zellulären Faktoren ist. Auch die Tatsache, dass die Integrität des perinukleären Proteinkomplexes beeinträchtigt ist, kann nicht als exklusiver Erklärungsansatz herangezogen werden. Diese Beobachtungen deuten auf die Beteiligung eines weiteren, möglicherweise p53-unabhängigen Faktors hin, der in Wechselwirkung mit E1B-55K zur Stimulierung der *Focus*-Bildung in Kooperation mit E1A beiträgt.

6.3.5 Die Bindung von Ad5 E1B-55K an Mre11 trägt zur vollständigen Transformation von BRK-Zellen bei

Die auf der Grundlage dieser Beobachtung durchgeführten Bindungsstudien zeigen, dass die eingeführten Mutationen bei E1B-RF6 einen negativen Einfluss auf die

Wechselwirkung mit Mre11, der zentralen Komponente des DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturkomplexes Mre11/Rad50/NBS1 haben.

Überraschenderweise kann die E1B-RF6-Mutante im Gegensatz zum Wildtypprotein nicht mehr Mre11 binden (Abb. 23), wodurch Mre11 auch eine E1B-55K-unabhängige subzelluläre Verteilung aufweist (Abb. 24). Obwohl die Inhibition des Kernexports von E1B-55K zu einer nukleären Lokalisation des viralen Proteins führt, kann keine Aggregation oder Kolo­kalisierung zusammen mit Mre11 beobachtet werden (Abb. 24 B). Diese beiden Ergebnisse zeigen, dass die direkte Wechselwirkung zwischen E1B-55K und Mre11 essentiell für die Sequestration von Mre11 in den perinukleären Proteinkomplex ist. Außerdem ist es wichtig für die nukleäre Aggregation von E1B-55K mit den PML-NBs nach Inhibition des CRM1-vermittelten Kernexports. Ebenfalls konsistent mit diesen Beobachtungen ist das Ergebnis, dass E1B-RF6 Defekte im proteasomalen Abbau von Mre11 besitzt, während der Abbau von p53 nicht eingeschränkt ist (Abb. 25). Dieses Ergebnis unterstützt die Beobachtung, dass keine Bindung an Mre11 stattfindet und darüber hinaus die Hypothese, dass E1B-55K die Funktion als Substratlieferant des E1B-55K/E4orf6-Komplexes übernimmt (Blanchette *et al.*, 2004).

6.3.6 Die mögliche Rolle der Wechselwirkung von Ad5 E1B-55K mit Mre11 in der Transformation

Auf der Grundlage der Beobachtungen mit der E1B-NES-Mutante im ersten Teil dieser Arbeit wurde diskutiert, dass das transformierende Potenzial der Ad2/5 E1B-55K-Proteine die Modulation von p53, PML und daxx und möglicherweise auch anderen PML-NB-assoziierten Proteinen umfasst. Die Ergebnisse der E1B-RF6-Mutante unterstreichen diese Hypothese, da Mre11 und der MRN-Komplex ein wichtiger Bestandteil der PML-NBs sind (Lombard und Guarente, 2000; Wu *et al.*, 2000; Boisvert *et al.*, 2005). Zudem ist für die E1B-55K induzierte Relokalisation der PML-Strukturen nach Blockierung des CRM1-vermittelten Kernexports die Interaktion zwischen E1B-55K und Mre11 und die Kolo­kalisierung der beiden Proteine

in den PML-NBs essentiell. Der Phänotyp der E1B-RF6-Mutante in den Transformationsversuchen wird durch die fehlende Wechselwirkung mit Mre11 hervorgerufen und gibt erstmalig einen Hinweis darauf, dass das transformierende Potenzial von E1B-55K auch über p53-unabhängige Mechanismen vermittelt wird. Weiterhin weisen die Ergebnisse mit dieser Mutante darauf hin, dass die Bindung an eine Komponente des MRN-Komplexes essentiell für die vollständige Transformation primärer BRK-Zellen durch E1B-55K in Kooperation mit E1A ist. Zudem ist die Wechselwirkung zwischen E1B-55K und Mre11 eine wichtige Voraussetzung für das Wachstum der transformierten Zelllinien, da die E1A/E1B-RF6-transformierten Zellen stark eingeschränkte Wachstumsraten aufweisen (Abb. 26), die subzelluläre Verteilung des Intermediärfilaments Vimentin dramatisch verändert ist (Abb. 27) und viele dieser Zellen mehrere Zellkerne haben (Abb. 28). Dies unterstreicht zusätzlich die Bedeutung der Wechselwirkung zwischen E1B-55K und Mre11 oder dem MRN-Komplex, da das Fehlen dieser Interaktion offensichtlich enorme Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten und die Zellteilung hat. Außerdem geben die Beobachtungen einen Hinweis darauf, dass E1B-55K möglicherweise eine Funktion von Mre11 verändert, die im Zusammenhang mit der Zellzykluskontrolle beim G2/M-Phasenübergang stehen könnte.

Der MRN-Komplex ist eine zentrale Komponente der zellulären Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche, wie z. B. homologe und nicht-homologe Rekombination, Telomer-Erhaltung und die Aktivierung von Kontrollpunkten nach Schädigung der DNA. Deshalb ist die Modulation von Mre11 durch E1B-55K nicht unwahrscheinlich, da der MRN-Komplex bzw. der zugehörige Signalweg Angriffspunkt zahlreicher viraler Proteine ist, wie z. B. Adenovirus E4orf3, E4orf6/E1B-55K (Stracker *et al.*, 2002; Carson *et al.*, 2003; Evans und Hearing, 2005; Araujo *et al.*, 2005; Stracker *et al.*, 2005; Hart *et al.*, 2005) oder SV40 *large-T* (Digweed *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2004). Während der viralen Infektion geht es dabei vor allem darum, die zellulären DNA-Reparaturmechanismen auszuschalten um die virale Replikation zu ermöglichen, die Ausbeute viraler DNAs zu steigern und die Konkatemerbildung der adenoviralen

Genome zu verhindern (Stracker *et al.*, 2002; Evans und Hearing, 2005; Carson *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004). Im Fall der Transformation führt ein Ausschalten der DNA-Reparaturmechanismen zu einer gesteigerten Mutationsrate und einer Anhäufung von Mutationen in der Zelle, die wiederum die Anzahl an transformierten Zellen steigern könnte.

Vorstellbar ist auch, dass E1B-55K im Falle der Transformation andere Funktionen des MRN-Komplexes, die nicht direkt mit der Reparatur von DNA-Schäden in Zusammenhang stehen, verändert. Kürzlich wurde berichtet, dass der MRN-Komplex eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Telomerenden und der Telomerase-unabhängigen alternativen Telomerverlängerung (*alternative lengthening of telomeres*; ALT) spielt, der insbesondere in immortalisierten und transformierten Zellen wichtig ist (Wu *et al.*, 2000; Henson *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2005). Normale somatische Zellen haben die Möglichkeit zu einer genau festgelegten Zahl an Zellteilungen und eine limitierte Fähigkeit zu proliferieren. Der „molekulare Zeitgeber“ dafür sind die Telomerenden. Diese linearen einzelstängigen Wiederholungen der Sequenz TTAGGG sind mit Telomer-bindenden Proteinen assoziiert und essentiell für die Chromosomenstabilität und die Genomintegrität (de Lange, 2002). Mit jeder Zellteilung werden die Telomere verkürzt und es kommt zur replikativen Seneszenz. Unterschreitet die Telomerlänge ein kritisches Minimum, tritt normalerweise der Zelltod ein. Auf diese Art und Weise ist die Verkürzung von Telomeren ein effizienter Mechanismus die Entartung von Zellen und die Tumorbildung zu unterdrücken (Hanahan, 2000). Die meisten Tumorzellen entkommen der limitierten Proliferationsfähigkeit deshalb, weil sie Mechanismen aktivieren, die die Telomerenden erhalten. Dies geschieht entweder durch Induktion der Telomerase oder durch Anschalten des ALT-Weges (Greider *et al.*, 1985; Bryan *et al.*, 1995). Es könnte deshalb sein, dass die Bindung von E1B-55K an Mre11 wichtig für die Transformation ist, weil E1B-55K die Funktionen von Mre11 im ALT-Prozess stimuliert und dadurch zur Transformation beiträgt. Hierfür spricht auch die Beobachtung aus den Wachstumsexperimenten mit den E1B-transformierten Zellen,

die zeigen, dass die Wachstums- und Überlebensrate der E1A/E1B-RF6-transformierten Zellen im Vergleich zu anderen Zellen deutlich herabgesetzt ist (Abb. 26).

Trotz dieser Möglichkeit ist die genaue Funktion der Interaktion zwischen E1B-55K und Mre11 jedoch noch unklar. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen mit der Mutante E1B-H354 zeigen, dass diese Mutante transformierendes Potenzial besitzt (Yew *et al.*, 1990; Yew und Berk, 1992), obwohl sie in Kooperation mit E4orf6 Mre11 nicht mehr dem proteasomalen Abbau zuführen kann (Carson *et al.*, 2003). Aus diesem Ergebnis wurde dann rückgeschlossen, dass E1B-55K als Substratlieferant des Komplexes nicht mehr in der Lage ist Mre11 zu binden. Dies ist zunächst widersprüchlich zu den hier gemachten Beobachtungen und bedarf weiterer funktioneller Untersuchungen der Mre11/E1B-55K-Interaktion. Möglicherweise unterstützt aber diese Beobachtung die Annahme, dass E1B-55K tatsächlich ein RING-Finger-Motiv besitzt. Wie schon in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe festgestellt werden konnte haben einzelne Mutationen, die mehr als 150 Aminosäuren voneinander entfernt sind, den gleichen Phänotyp (Zeller, 2004). Da RING-Finger-Motive vor allem für die Vermittlung von Protein-Proteininteraktionen wichtig sind, besteht die Möglichkeit, dass beide Mutationen die Interaktionsdomäne mit Mre11 zerstören, die unterschiedlichen Mutationen während der Transformation aber noch andere Auswirkungen haben. Trotzdem lassen die hier mit der Mutante E1B-RF6 gemachten Beobachtungen den Schluss zu, dass die Bindung an, die Kolokalisation mit und vermutlich auch die Modulation von Mre11 ein integraler Mechanismus ist über den E1B-55K zur vollständigen Zelltransformation in Kooperation mit E1A beiträgt.

6.3.7 Die Modulation der PML-NBs ist wichtig für die transformierenden Eigenschaften von Ad5 E1B-55K

Weiterhin bestätigen die Ergebnisse die Bedeutung der subnukleären PML-NBs bei der Ad5 E1A/E1B-vermittelten Transformation, da sowohl die DNA-

Doppelstrangbruch-Reparaturfunktion als auch der ALT-Mechanismus von Mre11 eng an dessen Lokalisation in den PML-NBs gekoppelt sind (Bernardi und Pandolfi, 2003; Dellaire und Bazett-Jones, 2004; Yeager *et al.*, 1999; Lombard und Guarente, 2000). Außerdem unterstützen sie die Hypothese, dass das transformierende Potenzial der Ad2/5 E1B-55K-Proteine nicht nur die Modulation von p53, PML und daxx, sondern auch anderer PML-NB-assoziiierter Proteine umfasst. Die Bedeutung der PML-assoziierten Strukturen für die virale Replikation zahlreicher DNA- und RNA-Viren wurde vielfach demonstriert. So befinden sich beispielsweise die viralen Replikationszentren von SV40, Ad5 oder HSV-1 in unmittelbarer Nähe zu diesen Strukturen, da vermutlich wichtige zelluläre Proteine die für die Replikation notwendig sind, dort gelagert werden (zur Übersicht: Maul, 1998). Außerdem werden die Komplexe im Verlauf der Virusinfektion durch virale Proteine umorganisiert um wahrscheinlich antivirale Schutzmechanismen der Zelle auszuschalten (zur Übersicht: Everett, 2001; Regad und Chelbi-Alix, 2001).

Die genaue Rolle von PML und der PML-NBs in der virusinduzierten Transformation ist immer noch unklar. Die Tatsache, dass Tumorsuppressorproteine (z. B. p53 und PML) und verschiedene virale Onkoproteine in den PML-NBs lokalisieren weist jedoch darauf hin, dass sie eine zentrale Funktion im viralen und zellulären Transformationsprozess einnehmen (Everett, 2001). Betrachtet man die subnukleären Strukturen der PML-NBs genauer, so fällt auf, dass PML ein essentieller Bestandteil dieser hochdynamischen Kompartimente ist. Neueste Arbeiten zeigen, dass PML als *upstream*-Regulator von p53 fungiert, indem es p53 in die PML-NBs rekrutiert, die p53-stimulierte Transkription verstärkt und seinen Abbau inhibiert (Ferbeyre *et al.*, 2000; Fogal *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2000; Pearson *et al.*, 2000; Bischof *et al.*, 2002; Louria-Hayon *et al.*, 2003; Kurki *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2003). Die Zusammensetzung der PMLNBs kann variieren und sie spielen eine entscheidende Rolle in der Antwort auf zellulären Stress, wie Hitzeschock, Apoptose, Seneszenz, DNA-Schädigungen, Tumorsuppression oder virale Infektionen. Sie fungieren als Orte an denen wichtige Proteinkomplexe z. B. für die Reparatur von

DNA-Schäden gebildet werden und an denen die post-translationale Modifikation wichtiger regulatorischer Faktoren wie p53 stattfindet. Ebenso wie p53 spielt auch PML eine wichtige Rolle in vielen zellulären Prozessen wie z. B. Differenzierung, Seneszenz und Apoptose (Salomoni und Pandolfi, 2002). Nach einem einfachen Modell dienen PML-NBs als makromolekulare Plattform an der die zentralen Vorgänge der Transkription, Replikation und Reparatur reguliert werden und sie bieten damit einen idealen Angriffspunkt um vielfältige Signalwege zu modulieren (Zhong *et al.*, 2000; Regad und Chelbi-Alix, 2001; Negorev und Maul, 2001; Dellaire und Bazett-Jones, 2004; Wojcik und DeMartino, 2003; Takahashi *et al.*, 2004).

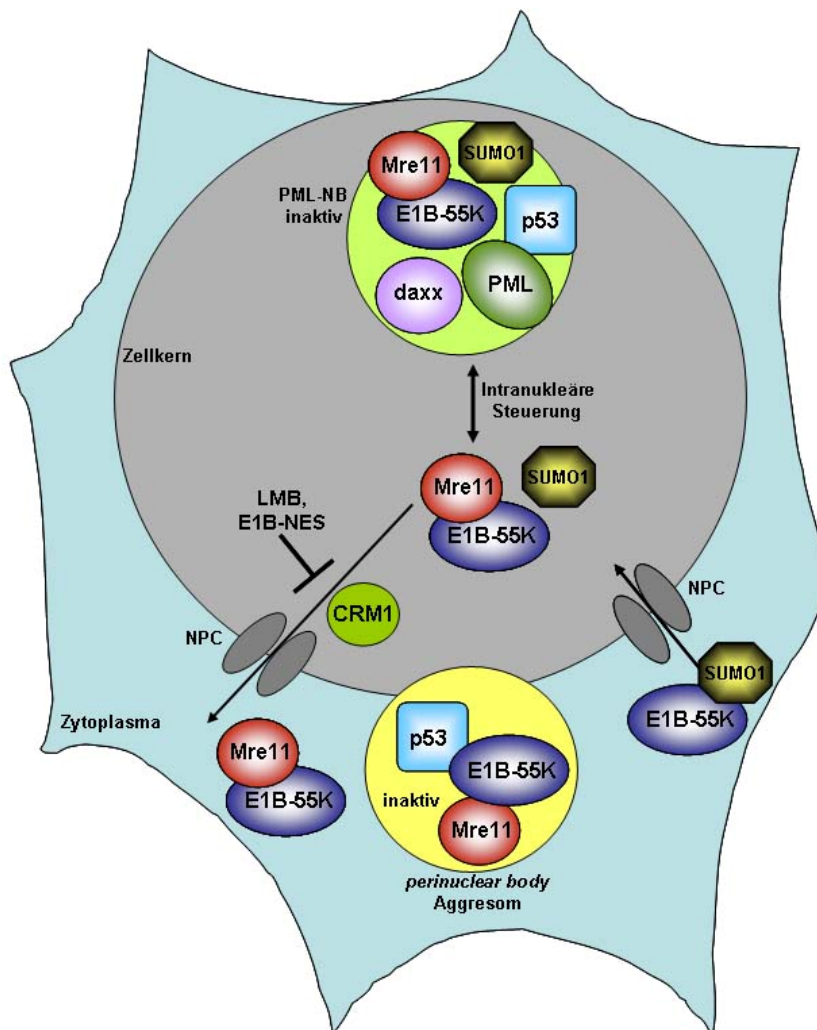


Abb. 29 Die mögliche Rolle von E1B-55K in der Transformation
 Beschreibung siehe Text unterhalb. NPC: nuclear pore complex; LMB: Leptomycin B.

Fasst man die bisher gemachten Beobachtungen zusammen, so lassen sich verschiedene Funktionen von E1B-55K während der Transformation primärer Nagetierzellen festlegen (Abb. 29). E1B-55K ist in der Lage p53 zu binden und die Transaktivierung p53-regulierter Gene zu inhibieren (Sarnow *et al.*, 1982; Kao *et al.*, 1990; Yew *et al.*, 1990; Shen *et al.*, 2001). Diese direkte Interaktion und die Repression der p53-vermittelten Transaktivierung sind essentiell für das transformierende Potenzial des viralen Proteins, da sie den E1A-induzierten antiproliferativen Eigenschaften entgegenwirken (Yew und Berk, 1992; Yew *et al.*, 1994). Gleichzeitig wird in transformierten Zellen der Tumorsuppressor E1B-55K-abhängig vom Zellkern in ein charakteristisches, zytoplasmatisches perinukleäres Proteinaggregat, relokalisiert (Zantema *et al.*, 1985a; Blair-Zajdel und Blair, 1988) und führt zu einer räumlichen Umlokalisierung und eventuellen Inaktivierung von p53. Auch Mre11, eine zentrale Komponente des DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturkomplexes, wird E1B-55K abhängig in den perinukleären Aggresom-ähnlichen Proteinkomplex transportiert und auf diese Weise effektiv inaktiviert. Im Gegensatz zur zytoplasmatischen Sequestration von p53 im perinukleären Proteinkomplex ist die Lokalisation von Mre11 dort aber abhängig vom CRM1-vermittelten Kernexport von E1B-55K (Abb. 24).

Im Zellkern sind für die intranukleäre Steuerung von E1B-55K zu den PML-NBs die post-translationale Modifikation des viralen Onkoproteins mit SUMO1 (Endter *et al.*, 2001) und die Interaktion mit Mre11 (Abb. 24) essentiell. Die Lokalisation von E1B-55K zusammen mit p53, PML, daxx und Mre11 in den PML-NBs und die direkte Wechselwirkung mit diesen Faktoren führt zu der Annahme, dass diese subnukleären Strukturen eine zentrale Stellung in der Ad5 E1A/E1B-vermittelten Transformation einnehmen, um die zellulären Faktoren und die zugehörigen Signalwege effizient zu modulieren. Welche zellulären Prozesse wie DNA-Reparaturwege oder ALT dabei neben den p53-abhängigen Funktionen tatsächlich beeinflusst werden, müssen weiterführende Arbeiten zeigen.

7 Literaturverzeichnis

- Alcalay, M., Tomassoni, L., Colombo, E., Stoldt, S., Grignani, F., Fagioli, M., Szekely, L., Helin, K. und Pelicci, P.G. (1998) The promyelocytic leukemia gene product (PML) forms stable complexes with the retinoblastoma protein. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 1084-1093.
- Ankerst, J. und Jonsson, N. (1989) Adenovirus type 9-induced tumorigenesis in the rat mammary gland related to sex hormonal state. *J. Natl. Cancer Inst.*, **81**, 294-298.
- Ankerst, J., Jonsson, N., Kjellen, L., Norrby, E. und Sjogren, H.O. (1974a) Induction of mammary fibroadenomas in rats by adenovirus type 9. *Int. J. Cancer*, **13**, 286-290.
- Ankerst, J., Steele, G., Jr. und Sjogren, H.O. (1974b) Cross-reacting tumor-associated antigen(s) of adenovirus type 9-induced fibroadenomas and a chemically induced mammary carcinoma in rats. *Cancer Res*, **34**, 1794-1800.
- Araujo, F.D., Stracker, T.H., Carson, C.T., Lee, D.V. und Weitzman, M.D. (2005) Adenovirus type 5 E4orf3 protein targets the Mre11 complex to cytoplasmic aggresomes. *J Virol*, **79**, 11382-11391.
- Ascoli, C.A. und Maul, G.G. (1991) Identification of a novel nuclear domain. *J. Cell. Biol.*, **112**, 785-795.
- Beck, K.F., Stathopoulos, I., Berninger, M.G. und Schweizer, M. (1993) Overcoming GC compression in nucleotide sequencing. *Biotechniques*, **14**, 375.
- Bell, P., Lieberman, P.M. und 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**, 11800-11810.
- Ben-Ze'ev, A., Babiss, L.E. und Fisher, P.B. (1986) Cleavage of vimentin in dense cell cultures. Inhibition upon transformation by type 5 adenovirus. *Exp Cell Res*, **166**, 47-62.
- Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L. und Finberg, R.W. (1997) Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, **275**, 1320-1323.
- Bernardi, R. und Pandolfi, P.P. (2003) Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death. *Oncogene*, **22**, 9048-9057.

- Bernards, R., Houweling, A., Schrier, P.I., Bos, J.L. und van der Eb, A.J. (1982) Characterization of cells transformed by Ad5/Ad12 hybrid early region I plasmids. *Virology*, **120**, 422-432.
- Bernards, R., Vaessen, M.J., Van der Eb, A.J. und Sussenbach, J.S. (1983) Construction and characterization of an adenovirus type 5/adenovirus type 12 recombinant virus. *Virology*, **131**, 30-38.
- Bernards, R. und Van der Eb, A.J. (1984) Adenovirus: transformation and oncogenicity. *Biochim. Biophys. Acta*, **783**, 187-204.
- Bischof, O., Kim, S.H., Irving, J., Beresten, S., Ellis, N.A. und Campisi, J. (2001) Regulation and localization of the Bloom syndrome protein in response to DNA damage. *J Cell Biol*, **153**, 367-380.
- Bischof, O., Kirsh, O., Pearson, M., Itahana, K., Pelicci, P.G. und Dejean, A. (2002) Deconstructing PML-induced premature senescence. *Embo J*, **21**, 3358-3369.
- Blair-Zajdel, M.E. und Blair, G.E. (1988) The intracellular distribution of the transformation-associated protein p53 in adenovirus-transformed rodent cells. *Oncogene*, **2**, 579-584.
- Blanchette, P., Cheng, C.Y., Yan, Q., Ketner, G., Ornelles, D.A., Dobner, T., Conaway, R.C., Conaway, J.W. und Branton, P.E. (2004) Both BC-box motifs of adenovirus protein E4orf6 are required to assemble an E3 ligase complex that degrades p53. *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 9619-9629.
- Boddy, M.N., Howe, K., Etkin, L.D., Solomon, E. und Freemont, P.S. (1996) PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene*, **13**, 971-982.
- Boisvert, F.M., Hendzel, M.J. und Bazett-Jones, D.P. (2000) Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *J Cell Biol*, **148**, 283-292.
- Boisvert, F.M., Hendzel, M.J., Masson, J.Y. und Richard, S. (2005) Methylation of MRE11 regulates its nuclear compartmentalization. *Cell Cycle*, **4**, 981-989.
- Boisvert, F.M., Kruhlak, M.J., Box, A.K., Hendzel, M.J. und Bazett-Jones, D.P. (2001) The transcription coactivator CBP is a dynamic component of the promyelocytic leukemia nuclear body. *J Cell Biol*, **152**, 1099-1106.
- Boivin, D., Morrison, M.R., Marcellus, R.C., Querido, E. und Branton, P.E. (1999) Analysis of synthesis, stability, phosphorylation, and interacting polypeptides

- of the 34-kilodalton product of open reading frame 6 of the early region 4 protein of human adenovirus type 5. *J. Virol.*, **73**, 1245-1253.
- Borden, K.L. (2000) RING Domains: Master Builders of Molecular Scaffolds? *J Mol Biol*, **295**, 1103-1112.
- Borden, K.L. (2002) Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 5259-5269.
- Borden, K.L., Campbell Dwyer, E.J. und Salvato, M.S. (1998) An arenavirus RING (zinc-binding) protein binds the oncoprotein promyelocyte leukemia protein (PML) and relocates PML nuclear bodies to the cytoplasm. *J. Virol.*, **72**, 758-766.
- Boyer, J., Rohleder, K. und Ketner, G. (1999) Adenovirus E4 34k and E4 11k inhibit double strand break repair and are physically associated with the cellular DNA-dependent protein kinase. *Virology*, **263**, 307-312.
- Boyer, J.L. und Ketner, G. (2000) Genetic analysis of a potential zinc-binding domain of the adenovirus E4 34k protein. *J. Biol. Chem.*, **275**, 14969-14978.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Bridge, E. und Ketner, G. (1989) Redundant control of adenovirus late gene expression by early region 4. *J Virol*, **63**, 631-638.
- Bridge, E. und Ketner, G. (1990) Interaction of adenoviral E4 and E1b products in late gene expression. *Virology*, **174**, 345-353.
- Brusca, J.S., Jannun, R. und Chinnadurai, G. (1984) Efficient transformation of rat 3Y1 cells by human adenovirus type 9. *Virology*, **136**, 328-337.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., und Short, J.M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with b-galactosidase selection. In *Biotechniques*, Vol. 5, pp. 376-379.
- Burgert, H.G. und Blusch, J.H. (2000) Immunomodulatory functions encoded by the E3 transcription unit of adenoviruses. *Virus Genes*, **21**, 13-25.
- Carlile, G.W., Tatton, W.G. und Borden, K.L. (1998) Demonstration of a RNA-dependent nuclear interaction between the promyelocytic leukaemia protein and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochem J*, **335 (Pt 3)**, 691-696.

- Carson, C.T., Schwartz, R.A., Stracker, T.H., Lilley, C.E., Lee, D.V. und Weitzman, M.D. (2003) The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. *Embo J*, **22**, 6610-6620.
- Carvalho, T., Seeler, J.S., Öhman, K., Jordan, P., Pettersson, U., Akusjärvi, G., Carmo Fonseca, M. und Dejean, A. (1995) Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies. *J. Cell. Biol.*, **131**, 45-56.
- Cathomen, T. und Weitzman, M.D. (2000) A functional complex of the adenovirus proteins E1B-55kDa and E4orf6 is necessary to modulate the expression level of p53 but not its transcriptional activity. *J. Virol.*, **74**, 11407-11412.
- Chan, J.Y., Li, L., Fan, Y.H., Mu, Z.M., Zhang, W.W. und Chang, K.S. (1997) Cell-cycle regulation of DNA damage-induced expression of the suppressor gene PML. *Biochem Biophys Res Commun*, **240**, 640-646.
- Chang, K.S., Lu, J.F., Wang, G., Trujillo, J.M., Estey, E., Cork, A., Chu, D.T., Freireich, E.J. und Stass, S.A. (1992) The t(15;17) breakpoint in acute promyelocytic leukemia cluster within two different sites of the myl gene: targets for the detection of minimal residual disease by the polymerase chain reaction. *Blood*, **79**, 554-558.
- Chauvin, C., Suh, M., Remy, C. und Benabid, A.L. (1990) Failure to detect viral genomic sequences of three viruses (herpes simplex, simian virus 40 and adenovirus) in human and rat brain tumors. *Ital. J. Neurol. Sci.*, **11**, 347-357.
- Ching, R.W., Dellaire, G., Eskiw, C.H. und Bazett-Jones, D.P. (2005) PML bodies: a meeting place for genomic loci? *J Cell Sci*, **118**, 847-854.
- Chinnadurai, G. (1998) Control of apoptosis by human adenovirus genes. *Semin Virol*, **8**, 399-408.
- Cockman, M.E., Masson, N., Mole, D.R., P., J., Chang, G.-W., Clifford, S.C., Maher, E.R., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. und Maxwell, P.H. (2000) Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem*, **275**, 25733-25741.
- Cook, J.L. und Lewis, A.M., Jr. (1987) Immunological surveillance against DNA-virus-transformed cells: correlations between natural killer cell cytolytic competence and tumor susceptibility of athymic rodents. *J Virol*, **61**, 2155-2161.
- D'Orazi, G., Cecchinelli, B., Bruno, T., Manni, I., Higashimoto, Y., Saito, S., Gostissa, M., Coen, S., Marchetti, A., Del Sal, G., Piaggio, G., Fanciulli, M., Appella, E. und Soddu, S. (2002) Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol*, **4**, 11-19.

- Davison, A.J., Benko, M. und Harrach, B. (2003) Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol*, **84**, 2895-2908.
- Day, P.M., Roden, R.B.S., Lowy, D.R. und 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**, 142-150.
- de Bruyn Kops, A. und Knipe, D.M. (1994) Preexisting nuclear architecture defines the intranuclear location of herpesvirus DNA replication structures. *J Virol*, **68**, 3512-3526.
- de The, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L. und Dejean, A. (1991) The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell*, **66**, 675-684.
- Debbas, M. und White, E. (1993) Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev.*, **7**, 546-554.
- Dellaire, G. und Bazett-Jones, D.P. (2004) PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays*, **26**, 963-977.
- Desbois, C., Rousset, R., Bantignies, F. und Jalinot, P. (1996) Exclusion of int-6 from PML nuclear bodies by binding to the HTLV-I tax oncoprotein. *Science*, **273**, 951-953.
- Devereux, J., Haeberli, P. und Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res*, **12**, 387-395.
- Digweed, M., Demuth, I., Rothe, S., Scholz, R., Jordan, A., Grotzinger, C., Schindler, D., Grompe, M. und Sperling, K. (2002) SV40 large T-antigen disturbs the formation of nuclear DNA-repair foci containing MRE11. *Oncogene*, **21**, 4873-4878.
- Dix, B.R., Edwards, S.J. und Braithwaite, A.W. (2001) Does the antitumor adenovirus ONYX-015/dl1520 selectively target cells defective in the p53 pathway? *J. Virol.*, **75**, 5443-5447.
- Dobner, T., Horikoshi, N., Rubenwolf, S. und Shenk, T. (1996) Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor. *Science*, **272**, 1470-1473.
- Dolph, P.J., Racaniello, V., Villamarin, A., Palladino, F. und Schneider, R.J. (1988) The adenovirus tripartite leader may eliminate the requirement for cap-binding protein complex during translation initiation. *J. Virol.*, **62**, 2059-2066.

-
- Dosch, T., Horn, F., Schneider, G., Krätzer, F., Dobner, T., Hauber, J. und 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**, 5677-5683.
- Doucas, V. und Evans, R.M. (1996) The PML nuclear compartment and cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, **1288**, M25-M29.
- Doucas, V. und Evans, R.M. (1999) Human T-cell leukemia retrovirus-Tax protein is a repressor of nuclear receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2633-2638.
- Doucas, V., Ishov, A.M., Romo, A., Juguilon, H., Weitzman, M.D., Evans, R.M. und Maul, G.G. (1996) Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure. *Genes Dev.*, **10**, 196-207.
- Duan, D., Yue, Y. und Engelhardt, J.F. (2001) Expanding AAV packaging capacity with trans-splicing or overlapping vectors: a quantitative comparison. *Mol Ther*, **4**, 383-391.
- Dulbecco, R. und Freeman, G. (1959) Plaque production by the polyoma virus. *Virology*, **8**, 396-397.
- Enders, J.F., Bell, J.A. und Dingle, J.H. (1956) "Adenoviruses": group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science*, **124**, 119-120.
- Endter, C. und Dobner, T. (2004) Cell transformation by human adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **273**, 163-214.
- Endter, C.*, Härtl, B.*, Spruss, T., Hauber, J. und Dobner, T. (2005) Blockage of CRM1-dependent nuclear export of the adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa protein augments oncogenic transformation of primary rat cells. *Oncogene*, **24**, 55-64. *= contributed equally
- Endter, C., Kzhyshkowska, J., Stauber, R. und Dobner, T. (2001) SUMO-1 modification required for transformation by adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 11312-11317.
- Eskiw, C.H. und Bazett-Jones, D.P. (2002) The promyelocytic leukemia nuclear body: sites of activity? *Biochem Cell Biol*, **80**, 301-310.
- Evans, J.D. und Hearing, P. (2005) Relocalization of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex by the adenovirus E4 ORF3 protein is required for viral replication. *J Virol*, **79**, 6207-6215.
- Everett, R.D. (2001) DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies. *Oncogene*, **20**, 7266-7273.

- Everett, R.D., Earnshaw, W.C., Pluta, A.F., Sternsdorf, T., Ainsztein, A.M., Carmena, M., Ruchaud, S., Hsu, W.L. und Orr, A. (1999) A dynamic connection between centromeres and ND10 proteins. *J Cell Sci*, **112**, 3443-3454.
- Everett, R.D. und Maul, G.G. (1994) HSV-1 IE protein Vmw110 causes redistribution of PML. *Embo J*, **13**, 5062-5069.
- Fagioli, M., Alcalay, M., Pandolfi, P.P., Venturini, L., Mencarelli, A., Simeone, A., Acampora, D., Grignani, F. und Pelicci, P.G. (1992) Alternative splicing of PML transcripts predicts coexpression of several carboxy-terminally different protein isoforms. *Oncogene*, **7**, 1083-1091.
- Fallaux, F.J., Bout, A., van der Velde, I., van den Wollenberg, D.J., Hehir, K.M., Keegan, J., Auger, C., Cramer, S.J., van Ormondt, H., van der Eb, A.J., Valerio, D. und Hoeben, R.C. (1998) New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther*, **9**, 1909-1917.
- Fallaux, F.J., Kranenburg, O., Cramer, S.J., Houweling, A., Van Ormondt, H., Hoeben, R.C. und Van Der Eb, A.J. (1996) Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.*, **7**, 215-222.
- Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C. und Lowe, S.W. (2000) PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev*, **14**, 2015-2027.
- Flenghi, L., Fagioli, M., Tomassoni, L., Pileri, S., Gambacorta, M., Pacini, R., Grignani, F., Casini, T., Ferrucci, P.F., Martelli, M.F. und et al. (1995) Characterization of a new monoclonal antibody (PG-M3) directed against the aminoterminal portion of the PML gene product: immunocytochemical evidence for high expression of PML proteins on activated macrophages, endothelial cells, and epithelia. *Blood*, **85**, 1871-1880.
- Fogal, V., Gostissa, M., Sandy, P., Zacchi, P., Sternsdorf, T., Jensen, K., Pandolfi, P.P., Will, H., Schneider, C. und Del Sal, G. (2000) Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *EMBO J.*, **19**, 6185-6195.
- Gallimore, P.H., Byrd, P.J., Grand, R.J., Whitaker, J.L., Breiding, D. und Williams, J. (1984) An examination of the transforming and tumor-inducing capacity of a number of adenovirus type 12 early region 1, hostrange mutants and cells transformed by subgenomic fragments of Ad12 E1 region. *Cancer Cells*, **2**, 519-526.
- Gallimore, P.H., Byrd, P.J., Whittaker, J.L. und Grand, R.J. (1985) Properties of rat cells transformed by DNA plasmids containing adenovirus type 12 E1 DNA or

- specific fragments of the E1 region: comparison of transforming frequencies. *Cancer Res.*, **45**, 2670-2680.
- Gallimore, P.H., Grand, R.J. und Byrd, P.J. (1986) Transformation of human embryo retinoblasts with simian virus 40, adenovirus and ras oncogenes. *Anticancer Res.*, **6**, 499-508.
- Gallimore, P.H. und Turnell, A.S. (2001) Adenovirus E1A: remodelling the host cell, a life or death experience. *Oncogene*, **20**, 7824-7835.
- Goddard, A.D., Borrow, J., Freemont, P.S. und Solomon, E. (1991) Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. *Science*, **254**, 1371-1374.
- Gooding, L.R. (1992) Virus proteins that counteract host immune defenses. *Cell*, **71**, 5-7.
- Gooding, L.R. und Wold, W.S. (1990) Molecular mechanisms by which adenoviruses counteract antiviral immune defenses. *Crit. Rev. Immunol.*, **10**, 53-71.
- Goodrum, F.D. und 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**, 548-561.
- Goodrum, F.D. und Ornelles, D.A. (1998) p53 status does not determine outcome of E1B 55-Kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *J. Virol.*, **72**, 9479-9490.
- Goodrum, F.D., Shenk, T. und 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**, 6323-6335.
- Gordon, C. (2002) The intracellular localization of the proteasome. *Curr Top Microbiol Immunol*, **268**, 175-184.
- Graham, F.L. (1984) Transformation by and oncogenicity of human adenoviruses. In Ginsberg, H.S. (ed.), *The adenoviruses*. Plenum Press, New York, pp. 339-398.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russel, W.C. und Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.*, **36**, 59-72.
- Grand, R.J., Grant, M.L. und Gallimore, P.H. (1994) Enhanced expression of p53 in human cells infected with mutant adenoviruses. *Virology*, **203**, 229-240.
- Grand, R.J., Parkhill, J., Szeszak, T., Rookes, S.M., Roberts, S. und 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**, 955-965.
- Grobelny, J.V., Godwin, A.K. und Broccoli, D. (2000) ALT-associated PML bodies are present in viable cells and are enriched in cells in the G(2)/M phase of the cell cycle. *J Cell Sci*, **113**, 4577-4585.
- Grotzinger, T., Sternsdorf, T., Jensen, K. und Will, H. (1996) Interferon-modulated expression of genes encoding the nuclear-dot-associated proteins Sp100 and promyelocytic leukemia protein (PML). *Eur J Biochem*, **238**, 554-560.
- Guldner, H.H., Szosteki, C., Grotzinger, T. und Will, H. (1992) IFN enhance expression of Sp100, an autoantigen in primary biliary cirrhosis. *J Immunol*, **149**, 4067-4073.
- Guo, A., Salomoni, P., Luo, J., Shih, A., Zhong, S., Gu, W. und Paolo Pandolfi, P. (2000) The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat. Cell. Biol.*, **2**, 730-736.
- Halbert, D.N., Cutt, J.R. und Shenk, T. (1985) Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *J. Virol.*, **56**, 250-257.
- Haley, K.P., Overhauser, J., Babiss, L.E., Ginsberg, H.S. und Jones, N.C. (1984) Transformation properties of type 5 adenovirus mutants that differentially express the E1A gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **81**, 5734-5738.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, **41**, 95-98.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hanahan, D. (2000) Benefits of bad telomeres. *Nature*, **406**, 573-574.
- Harada, J.N., Shevchenko, A., Pallas, D.C. und Berk, A.J. (2002) Analysis of the adenovirus E1B-55K-anchored proteome reveals its link to ubiquitination machinery. *J. Virol.*, **76**, 9194-9206.
- Harlow, E., Franza, B.R., Jr. und Schley, C. (1985) Monoclonal antibodies specific for adenovirus early region 1A proteins: extensive heterogeneity in early region 1A products. *J. Virol.*, **55**, 533-546.
- Harlow, E. und Lane, D.P. (1988) *Antibodies, a laboratory manual.*, Cold Spring Harbor.
- Hart, L.S., Yannone, S.M., Naczki, C., Orlando, J.S., Waters, S.B., Akman, S.A., Chen, D.J., Ornelles, D. und Koumenis, C. (2005) The adenovirus E4orf6 protein

- inhibits DNA double strand break repair and radiosensitizes human tumor cells in an E1B-55K-independent manner. *J. Biol. Chem.*, **280**, 1474-14781.
- Henson, J.D., Neumann, A.A., Yeager, T.R. und Reddel, R.R. (2002) Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene*, **21**, 598-610.
- Hilleman, M.R. und Werner, J.H. (1954) Recovery of new agents from patients with acute respiratory illness. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **85**, 183-188.
- Hofmann, T.G., Moller, A., Sirma, H., Zentgraf, H., Taya, Y., Droge, W., Will, H. und Schmitz, M.L. (2002) Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat Cell Biol*, **4**, 1-10.
- Hofmann, T.G. und Will, H. (2003) Body language: the function of PML nuclear bodies in apoptosis regulation. *Cell Death Differ.*, **10**, 1290-1299.
- Horwitz, M.S. (1996) Adenoviruses. In Fields, B.N., Knipe, D.M. und Howley, P.M. (eds.), *Virology*. Lippincott-Raven, New York, Vol. 2, pp. 2149-2171.
- Horwitz, M.S. (2001) Adenovirus immunoregulatory genes and their cellular targets. *Virology*, **279**, 1-8.
- Houweling, A., van den Elsen, P.J. und van der Eb, A.J. (1980) Partial transformation of primary rat cells by the leftmost 4.5% fragment of adenovirus 5 DNA. *Virology*, **105**, 537-550.
- Huang, M.M. und Hearing, P. (1989) Adenovirus early region 4 encodes two gene products with redundant effects in lytic infection. *J. Virol.*, **63**, 2605-2615.
- Huebner, R.J., Rowe, W.P., Ward, T.G., Parrot, R.H. und Bell, J.A. (1954) Adenoidal-pharyngeal conjunctival agents. *N. Engl. J. Med.*, **251**, 1077-1086.
- Hutton, F.G., Turnell, A.S., Gallimore, P.H. und Grand, R.J. (2000) Consequences of disruption of the interaction between p53 and the larger adenovirus early region 1B protein in adenovirus E1 transformed human cells. *Oncogene*, **19**, 452-462.
- Ishov, A.M. und Maul, G.G. (1996) The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition. *J. Cell. Biol.*, **134**, 815-826.
- Ishov, A.M., Sotnikov, A.G., Negorev, D., Vladimirova, O.V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E.T., Strauss, J.F., 3rd und 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**, 221-234.

- Ishov, A.M., Stenberg, R.M. und Maul, G.G. (1997) Human cytomegalovirus immediate early interaction with host nuclear structures: definition of an immediate transcript environment. *J. Cell. Biol.*, **138**.
- Jackson, P., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K. und Reimann, J.D.R. (2000) The lore of the RINGS: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends in Cell Biology*, **10**, 429-439.
- Javier, R.T., Raska, K., Jr., Macdonald, G.J. und Shenk, T. (1991) Human adenovirus type 9-induced rat mammary tumors. *J. Virol.*, **65**, 3192-3202.
- Javier, R.T., Raska, K., Jr. und Shenk, T. (1992) Requirement for the adenovirus type 9 E4 region in production of mammary tumors. *Science*, **257**, 1267-1271.
- Jensen, K., Shiels, C. und Freemont, P.S. (2001) PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene*, **20**, 7223-7233.
- Jiang, W.Q., Zhong, Z.H., Henson, J.D., Neumann, A.A., Chang, A.C. und Reddel, R.R. (2005) Suppression of alternative lengthening of telomeres by Sp100-mediated sequestration of the MRE11/RAD50/NBS1 complex. *Mol Cell Biol*, **25**, 2708-2721.
- Joazeiro, C.A. und Weissman, A.M. (2000) RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*, **102**, 549-552.
- Jonsson, N. und Ankerst, J. (1977) Studies on adenovirus type 9-induced mammary fibroadenomas in rats and their malignant transformation. *Cancer*, **39**, 2513-2519.
- Kakizuka, A., Miller, W.H., Jr., Umesono, K., Warrell, R.P., Jr., Frankel, S.R., Murty, V.V., Dmitrovsky, E. und Evans, R.M. (1991) Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell*, **66**, 663-674.
- Kamura, T., Burian, D., Yan, Q., Schmidt, S.L., Lane, W.S., Querido, E., Branton, P.E., Shilatifard, A., Conaway, R.C. und Conaway, J.W. (2001) MUF1, a novel Elongin BC-interacting leucine-rich repeat protein that can assemble with Cul5 and Rbx1 to reconstitute a ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.*, **30**, 30.
- Kamura, T., Maenaka, K., Kotoshiba, S., Matsumoto, M., Kohda, D., Conaway, R.C., Conaway, J.W. und Nakayama, K.I. (2004) VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. *Genes Dev*, **18**, 3055-3065.
- Kamura, T., Sato, S., Haque, D., Liu, L., Kaelin, W.G., Jr., Conaway, R.C. und Conaway, J.W. (1998) The Elongin BC complex interacts with the conserved

- SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev*, **12**, 3872-3881.
- Kao, C.C., Yew, P.R. und Berk, A.J. (1990) Domains required for in vitro association between the cellular p53 and the adenovirus 2 E1B 55K proteins. *Virology*, **179**, 806-814.
- Kastner, P., Perez, A., Lutz, Y., Rochette Egly, C., Gaub, M.P., Durand, B., Lanotte, M., Berger, R. und Chambon, P. (1992) Structure, localization and transcriptional properties of two classes of retinoic acid receptor alpha fusion proteins in acute promyelocytic leukemia (APL): structural similarities with a new family of oncoproteins. *EMBO J.*, **11**, 629-642.
- Kelly, C., Van Driel, R. und Wilkinson, G.W. (1995) Disruption of PML-associated nuclear bodies during human cytomegalovirus infection. *J Gen Virol*, **76**, 2887-2893.
- Kibel, A., Iliopoulos, O., DeCaprio, J.A. und Kaelin, W.G. (1995) Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to Elongin B and C. *Science*, **269**, 1444-1446.
- König, C., Roth, J. und Dobbelstein, M. (1999) Adenovirus type 5 E4orf3 protein relieves p53 inhibition by E1B-55-kilodalton protein. *J. Virol.*, **73**, 2253-2262.
- Kopito, R.R. (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell. Biol.*, **10**, 524-530.
- Korioth, F., Maul, G.G., Plachter, B., Stamminger, T. und Frey, J. (1996) The nuclear domain 10 (ND10) is disrupted by the human cytomegalovirus gene product IE1. *Exp Cell Res*, **229**, 155-158.
- Krätzer, F., Dosch, T., Kzhyshkowska, J., Schneider, G., Brenner, M., Dobner, T., Hauber, J. und Stauber, R. (2001) The adenovirus E1B-55K binding protein E1B-AP5: a mobile tumor suppressor containing multiple import signals and a CRM1-dependent export signal. *ICRF/UCSF 2001 DNA Tumour Virus Meeting*, Cambridge, England.
- Krätzer, F., Rosorius, O., Heger, P., Hirschmann, N., Dobner, T., Hauber, J. und Stauber, R.H. (2000) The adenovirus type 5 E1B-55k oncoprotein is a highly active shuttle protein and shuttling is independent of E4orf6, p53 and Mdm2. *Oncogene*, **19**, 850-857.
- Kuhlmann, I., Achten, S., Rudolph, R. und Dörfler, 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.

- Kurki, S., Latonen, L. und Laiho, M. (2003) Cellular stress and DNA damage invoke temporally distinct Mdm2, p53 and PML complexes and damage-specific nuclear relocalization. *J Cell Sci*, **116**, 3917-3925.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lafarga, M., Berciano, M.T., Pena, E., Mayo, I., Castano, J.G., Bohmann, D., Rodrigues, J.P., Tavanez, J.P. und Carmo-Fonseca, M. (2002) Clastosome: a subtype of nuclear body enriched in 19S and 20S proteasomes, ubiquitin, and protein substrates of proteasome. *Mol Biol Cell*, **13**, 2771-2782.
- Lai, H.-K. und Borden, K.L.B. (2000) The promyelocytic leukemia (PML) protein suppresses cyclin D1 protein production by altering the nuclear cytoplasmic distribution of cyclin D1 mRNA. *Oncogene*, **19**, 1623-1634.
- Lallemand-Breitenbach, V., Zhu, J., Puvion, F., Koken, M., Honore, N., Doubeikovsky, A., Duprez, E., Pandolfi, P.P., Puvion, E., Freemont, P. und 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**, 1361-1371.
- LaMorte, V.J., Dyck, J.A., Ochs, R.L. und 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**, 4991-4996.
- Lavau, C., Marchio, A., Fagioli, M., Jansen, J., Falini, B., Lebon, P., Grosveld, F., Pandolfi, P.P., Pelicci, P.G. und Dejean, A. (1995) The acute promyelocytic leukaemia-associated PML gene is induced by interferon. *Oncogene*, **11**, 871-876.
- Leppard, K.N. und 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.
- Lethbridge, K.J., Scott, G.E. und Leppard, K.N. (2003) Nuclear matrix localization and SUMO-1 modification of adenovirus type 5 E1b 55K protein are controlled by E4 Orf6 protein. *J. Gen. Virol.*, **84**, 259-268.
- Liu, J.-H., Mu, Z.-M. und Chang, K.-S. (1995) PML suppresses oncogenic transformation of NIH/3T3 cells by activated neu. *J. Exp. Med.*, **181**, 1965-1973.
- Liu, Y., Colosimo, A.L., Yang, X.J. und Liao, D. (2000) Adenovirus E1B 55-kilodalton oncoprotein inhibits p53 acetylation by PCAF. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 5540-5553.

-
- Liu, Y., Shevchenko, A., Shevchenko, A. und Berk, A.J. (2005) Adenovirus exploits the cellular aggresome response to accelerate inactivation of the MRN complex. *J Virol*, **79**, 14004-14016.
- Lombard, D.B. und Guarente, L. (2000) Nijmegen breakage syndrome disease protein and MRE11 at PML nuclear bodies and meiotic telomeres. *Cancer Res*, **60**, 2331-2334.
- Louria-Hayon, I., Grossman, T., Sionov, R.V., Alsheich, O., Pandolfi, P.P. und Haupt, Y. (2003) The promyelocytic leukemia protein protects p53 from Mdm2-mediated inhibition and degradation. *J Biol Chem*, **278**, 33134-33141.
- Lowe, S.W. und Ruley, H.E. (1993) Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev.*, **7**, 535-545.
- Mackey, J.K., Green, M., Wold, W.S. und Rigden, P. (1979) Analysis of human cancer DNA for DNA sequences of human adenovirus type 4. *J Natl Cancer Inst*, **62**, 23-26.
- Mackey, J.K., Rigden, P.M. und Green, M. (1976) Do highly oncogenic group A human adenoviruses cause human cancer? Analysis of human tumors for adenovirus 12 transforming DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 4657-4661.
- Mannick, J.B., Cohen, J.I., Birkenbach, M., Marchini, A. und Kieff, E. (1991) The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation. *J Virol*, **65**, 6826-6837.
- Marcellus, R.C., Teodoro, J.G., Charbonneau, R., Shore, G.C. und Branton, P.E. (1996) Expression of p53 in Saos-2 osteosarcoma cells induces apoptosis which can be inhibited by Bcl-2 or the adenovirus E1B-55 kDa protein. *Cell. Growth Differ.*, **7**, 1643-1650.
- Martin, M.E. und Berk, A.J. (1998) Adenovirus E1B 55K represses p53 activation in vitro. *J. Virol.*, **72**, 3146-3154.
- Martin, M.E. und Berk, A.J. (1999) Corepressor required for adenovirus E1B 55,000-molecular-weight protein repression of basal transcription. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 3403-3414.
- Mathias, P., Wickham, T., Moore, M. und Nemerow, G. (1994) Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. *J Virol*, **68**, 6811-6814.
- Matthews, J.M. und Sunde, M. (2002) Zinc fingers--folds for many occasions. *IUBMB Life*, **54**, 351-355.

-
- Maul, G.G. (1998) Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication. *BioEssays*, **20**,8, 660-667.
- Maul, G.G., Guldner, H.H. und Spivack, J.G. (1993) Modification of discrete nuclear domains induced by herpes simplex virus type 1 immediate early gene 1 product (ICP0). *J Gen Virol*, **74**, 2679-2690.
- Maul, G.G., Ishov, A.M. und Everett, R.D. (1996) Nuclear domain 10 as preexisting potential replication start sites of herpes simplex virus type-1. *Virology*, **217**, 67-75.
- Maul, G.G., Yu, E., Ishov, A.M. und Epstein, A.L. (1995) Nuclear domain 10 (ND10) associated proteins are also present in nuclear bodies and redistribute to hundreds of nuclear sites after stress. *J Cell Biochem*, **59**, 498-513.
- Maxwell, P.H., Wiesner, M.S., Chang, G.-W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R. und Ratcliffe, P.J. (1999) The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, **399**, 271-275.
- McLorie, W., McGlade, C.J., Takayesu, D. und Branton, P.E. (1991) Individual adenovirus E1B proteins induce transformation independently but by additive pathways. *J. Gen. Virol.*, **72**, 1467-1471.
- Melnick, A. und Licht, J.D. (1999) Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, **93**, 3167-3215.
- Mitsudomi, T., Steinberg, S.M., Nau, M.M., Carbone, D., D'Amico, D., Bodner, H.K., Oie, H.K., Linnoila, R.I., Mulshine, J.L., Minna, J.D. und Gazdar, A.F. (1992) p53 gene mutations in non-small-lung cell cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene*, **7**, 171-180.
- Modrow, S. und Falke, D. (1997) *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Mohammadi, E.S., Ketner, E.A., Johns, D.C. und Ketner, G. (2004) Expression of the adenovirus E4 34k oncoprotein inhibits repair of double strand breaks in the cellular genome of a 293-based inducible cell line. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 2652-2659.
- Moore, M., Horikoshi, N. und Shenk, T. (1996) Oncogenic potential of the adenovirus E4orf6 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11295-11301.

-
- Moran, E. (1994) Mammalian cell growth controls reflected through protein interactions with the adenovirus E1A gene products. *Semin. Virol.*, **5**, 327-340.
- Moran, E., Grodzicker, T., Roberts, R.J., Mathews, M.B. und Zerler, B. (1986) Lytic and transforming functions of individual products of the adenovirus E1A gene. *J. Virol.*, **57**, 765-775.
- Nakamura, S., Roth, J.A. und Mukhopadhyay, T. (2000) Multiple lysine mutations in the C-terminal domain of p53 interfere with MDM2-dependent protein degradation and ubiquitination. *Mol Cell Biol*, **20**, 9391-9398.
- Negorev, D. und Maul, G.G. (2001) Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot. *Oncogene*, **20**, 7234-7242.
- Nevels, M., Spruss, T., Wolf, H. und Dobner, T. (1999a) The adenovirus E4orf6 protein contributes to malignant transformation by antagonizing E1A-induced accumulation of the tumor suppressor protein p53. *Oncogene*, **18**, 9-17.
- Nevels, M., Täuber, B., Kremmer, E., Spruss, T., Wolf, H. und Dobner, T. (1999b) Transforming potential of the adenovirus type 5 E4orf3 protein. *J. Virol.*, **73**, 1591-1600.
- Nevins, J.R. und Vogt, P.K. (1996) Cell transformation by viruses. In Fields, B.N., Knipe, D.M. und Howley, P.M. (eds.), *Virology*. Lippincott-Raven, New York, Vol. 1, pp. 301-343.
- Nicolas, A.L., Munz, P.L., Falck Pedersen, E. und Young, C.S. (2000) Creation and repair of specific DNA double-strand breaks in vivo following infection with adenovirus vectors expressing *Saccharomyces cerevisiae* HO endonuclease. *Virology*, **266**, 211-224.
- Ohh, M., Park, C.W., Ivan, M., Hoffman, M.A., Kim, T.-Y., Huang, L.E., Pavletich, N., Chau, V. und Kaelin, W.G. (2000) Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding of the β -domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol*, **2**, 423-427.
- Orlando, J.S. und Ornelles, D.A. (1999) An arginine-faced amphipathic alpha helix is required for adenovirus type 5 E4orf6 protein function. *J. Virol.*, **73**, 4600-4610.
- Pandolfi, P.P., Grignani, F., Alcalay, M., Mencarelli, A., Biondi, A., LoCoco, F., Grignani, F. und Pelicci, P.G. (1991) Structure and origin of the acute promyelocytic leukemia myl/RAR alpha cDNA and characterization of its retinoid-binding and transactivation properties. *Oncogene*, **6**, 1285-1292.

- Paraskeva, C., Brown, K.W., Dunn, A.R. und Gallimore, P.H. (1982) Adenovirus type 12-transformed rat embryo brain and rat liver epithelial cell lines: adenovirus type 12 genome content and viral protein expression. *J Virol*, **44**, 759-764.
- Paraskeva, C. und Gallimore, P.H. (1980) Tumorigenicity and in vitro characteristics of rat liver epithelial cells and their adenovirus-transformed derivatives. *Int J Cancer*, **25**, 631-639.
- Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P.P. und Pelicci, P.G. (2000) PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature*, **406**, 207-210.
- Pfeffer, A., Schubbert, R., Orend, G., Hilger-Eversheim, K. und 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**, 113-127.
- Pichler, A., Gast, A., Seeler, J.S., Dejean, A. und Melchior, F. (2002) The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell*, **108**, 109-120.
- Punga, T. und Akusjarvi, G. (2003) Adenovirus 2 E1B-55K protein relieves p53-mediated transcriptional repression of the survivin and MAP4 promoters. *FEBS Lett.*, **552**, 214-218.
- Punga, T. und Akusjärvi, G. (2000) The adenovirus-2 E1B-55K protein interacts with a mSin3A/histone deacetylase 1 complex. *FEBS Lett.*, **476**, 248-252.
- Puvion-Dutilleul, F., Chelbi-Alix, M.K., Koken, M., Quignon, F., Puvion, E. und 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.
- Querido, E., Blanchette, P., Yan, Q., Kamura, T., Morrison, M., Boivin, D., Kaelin, W.G., Conaway, R.C., Conaway, J.W. und Branton, P.E. (2001a) Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes Dev.*, **15**, 3104-3117.
- Querido, E., Marcellus, R.C., Lai, A., Rachel, C., Teodoro, J.G., Ketner, G. und Branton, P.E. (1997) Regulation of p53 levels by the E1B 55-kilodalton protein and E4orf6 in adenovirus-infected cells. *J. Virol.*, **71**, 3788-3798.
- Querido, E., Morisson, M.R., Chu-Pham-Dang, H., Thirlwell, S.W., Boivin, D. und Branton, P.E. (2001b) Identification of three functions of the adenovirus E4orf6 protein that mediate p53 degradation by the E4orf6-E1B55K complex. *J. Virol.*, **75**, 699-709.

- Raska, K., Jr. und Gallimore, P.H. (1982) An inverse relation of the oncogenic potential of adenovirus-transformed cells and their sensitivity to killing by syngeneic natural killer cells. *Virology*, **123**, 8-18.
- Regad, T. und Chelbi-Alix, M.K. (2001) Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene*, **20**, 7274-7286.
- Roth, J., König, C., Wienzek, S., Weigel, S., Ristea, S. und Dobbelstein, M. (1998) Inactivation of p53 but not p73 by adenovirus type 5 E1B 55-Kilodalton and E4 34-Kilodalton oncoproteins. *J. Virol.*, **72**, 8510-8516.
- Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrot, R.H. und Ward, T.G. (1953) Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **84**, 570-573.
- Rubenwolf, S., Schütt, H., Nevels, M., Wolf, H. und Dobner, T. (1997) Structural analysis of the adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton-E4orf6 protein complex. *J. Virol.*, **71**, 1115-1123.
- Ruggero, D., Wang, Z.G. und Pandolfi, P.P. (2000) The puzzling multiple lives of PML and its role in the genesis of cancer. *Bioessays*, **22**, 827-835.
- Ruley, H.E. (1983) Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature*, **304**, 602-606.
- Russell, W.C. (2000) Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol*, **81**, 2573-2604.
- Sabbatini, P., Chiou, S.K., Rao, L. und White, E. (1995) Modulation of p53-mediated transcriptional repression and apoptosis by the adenovirus E1B 19K protein. *Mol Cell Biol*, **15**, 1060-1070.
- Sadowski, I. und Ptashne, M. (1989) A vector for expressing GAL4(1-147) fusions in mammalian cells. *Nucl. Acids Res.*, **17**, 7539.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Salomoni, P. und Pandolfi, P.P. (2002) The role of PML in tumor suppression. *Cell*, **108**, 165-170.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanz, M.M., Proytcheva, M., Ellis, N.A., Holloman, W.K. und German, J. (2000) BLM, the Bloom's syndrome protein, varies during the cell cycle in its amount,

- distribution, and co-localization with other nuclear proteins. *Cytogenet Cell Genet*, **91**, 217-223.
- Sarnow, P., Hearing, P., Anderson, C.W., Halbert, D.N., Shenk, T. und Levine, A.J. (1984) Adenovirus early region 1B 58,000-dalton tumor antigen is physically associated with an early region 4 25,000-dalton protein in productively infected cells. *J. Virol.*, **49**, 692-700.
- Sarnow, P., Ho, Y.S., Williams, J. und 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**, 387-394.
- Saurin, A.J., Borden, K.L., Boddy, M.N. und Freemont, P.S. (1996) Does this have a familiar RING? *Trends Biochem Sci*, **21**, 208-214.
- Sawada, Y., Raska, K., Jr. und Shenk, T. (1988) Adenovirus type 5 and adenovirus type 12 recombinant viruses containing heterologous E1 genes are viable, transform rat cells, but are not tumorigenic in rats. *Virology*, **166**, 281-284.
- Schiedner, G., Hertel, S. und Kochanek, S. (2000) Efficient transformation of primary human amniocytes by E1 functions of ad5: generation of new cell lines for adenoviral vector production. *Hum. Gene Ther.*, **11**, 2105-2116.
- Sharma, R.C. und Schimke, R.T. (1996) Preparation of electrocompetent E. coli using salt-free growth medium. In *Biotechniques*, Vol. 20, pp. 42-44.
- Shaw, G., Morse, S., Ararat, M. und Graham, F.L. (2002) Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *Faseb J.*, **16**, 869-871.
- Shen, Y., Kitzes, G., Nye, J.A., Fattaey, A. und Hermiston, T. (2001) Analyses of single-amino-acid substitution mutants of adenovirus type 5 E1B-55K protein. *J. Virol.*, **75**, 4297-4307.
- Shenk, T. (2001) Adenoviridae: the viruses and their replication. In Knipe, D.M. und Howley, P.M. (eds.), *Virology*. Lippincott-Raven, New York, Vol. 2, pp. 2265-2300.
- Shepherd, S.E., Howe, J.A., Mymryk, J.S. und 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**, 2944-2949.
- Sinclair, A.J., Palmero, I., Peters, G. und Farrell, P.J. (1994) EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *Embo J*, **13**, 3321-3328.

- Smith, D.B. und Johnson, K.S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, **67**, 31-40.
- Stadler, M., Chelbi-Alix, M.K., Koken, M.H., Venturini, L., Lee, C., Saib, A., Quignon, F., Pelicano, L., Guillemin, M.C., Schindler, C. und et al. (1995) Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene*, **11**, 2565-2573.
- Stebbins, C.E., Kaelin, W.G. und Pavletich, N.P. (1999) Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science*, **284**, 455-461.
- Steegega, W.T., Riteco, N., Jochemsen, A.G., Fallaux, F.J. und Bos, J.L. (1998) The large E1B protein together with the E4orf6 protein target p53 for active degradation in adenovirus infected cells. *Oncogene*, **16**, 349-357.
- Stewart, P.L., Fuller, S.D. und Burnett, R.M. (1993) Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *Embo J*, **12**, 2589-2599.
- Stracker, T.H., Carson, C.T. und Weitzman, M.D. (2002) Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11 Rad50 NBS1 DNA repair complex. *Nature*, **418**, 348-352.
- Stracker, T.H., Lee, D.V., Carson, C.T., Araujo, F.D., Ornelles, D.A. und Weitzman, M.D. (2005) Serotype-specific reorganization of the Mre11 complex by adenoviral E4orf3 proteins. *J Virol*, **79**, 6664-6673.
- Stuurman, N., de Graaf, A., Floore, A., Josso, A., Humbel, B., de Jong, L. und van Driel, R. (1992) A monoclonal antibody recognizing nuclear matrix-associated nuclear bodies. *J. Cell Science*, **101**, 773-784.
- Szekely, L., Pokrovskaja, K., Jiang, W.G., de Thè, H., Ringertz, N. und Klein, G. (1996) The Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA5 accumulates in PML-containing bodies. *J. Virol.*, **70**, 2562-2568.
- Szostecki, C., Guldner, H.H., Netter, H.J. und Will, H. (1990) Isolation and characterization of cDNA encoding a human nuclear antigen predominantly recognized by autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis. *J Immunol*, **145**, 4338-4347.
- Takahashi, Y., Lallemand-Breitenbach, V., Zhu, J. und de The, H. (2004) PML nuclear bodies and apoptosis. *Oncogene*, **23**, 2819-2824.
- Täuber, B. und Dobner, T. (2001a) Adenovirus early E4 genes in viral oncogenesis. *Oncogene*, **20**, 7847-7854.

- Täuber, B. und Dobner, T. (2001b) Molecular regulation and biological function of adenovirus early genes: the E4 ORFs. *Gene*, **278**, 1-23.
- Teodoro, J.G. und 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**, 3620-3627.
- Teodoro, J.G., Halliday, T., Whalen, S.G., Takayesu, D., Graham, F.L. und Branton, P.E. (1994) Phosphorylation at the carboxy terminus of the 55-kilodalton adenovirus type 5 E1B protein regulates transforming activity. *J. Virol.*, **68**, 776-786.
- Teodoro, J.G., Shore, G.C. und Branton, P.E. (1995) Adenovirus E1A proteins induce apoptosis by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene*, **11**, 467-474.
- Terris, B., Baldin, V., Dubois, S., Degott, C., Flejou, J.-F., Hénin, D. und Dejean, A. (1995) PML nuclear bodies are general targets for inflammation and cell proliferation. *Cancer Research*, **55**, 1590-1597.
- Tooze, J. (1981) DNA tumor viruses. In *Cold Spring Harbor*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, Vol. 2nd ed., pp. 943-1054.
- Trentin, J.J., Yabe, Y. und Taylor, G. (1962) The quest for human cancer viruses: a new approach to an old problem reveals cancer induction in hamster by human adenoviruses. *Science*, **137**, 835-849.
- Turelli, P., Doucas, V., Craig, E., Mangeat, B., Klages, N., Evans, R., Kalpana, G. und Trono, D. (2001) Cytoplasmic recruitment of INI1 and PML on incoming HIV preintegration complexes: interference with early steps of viral replication. *Mol Cell*, **7**, 1245-1254.
- Turnell, A.S., Grand, R.J., Gorbea, C., Zhang, X., Wang, W., Mymryk, J.S. und Gallimore, P.H. (2000) Regulation of the 26S proteasome by adenovirus E1A. *Embo J*, **19**, 4759-4773.
- van den Heuvel, S.J.L., The, S.I., Klein, B., Jochemsen, A.G., Zantema, A. und van der Eb, A.J. (1992) p53 shares an antigenic determinant with proteins of 92 and 150 kilodaltons that may be involved in senescence of human cells. *J. Virol.*, **66**, 591-595.
- van den Heuvel, S.J.L., van Laar, T., Kast, W.M., Melief, C.J.M., Zantema, A. und van der Eb, A.J. (1990) Association between the cellular p53 and the adenovirus 5 E1B-55kd proteins reduces the oncogenicity of Ad-transformed cells. *EMBO J.*, **9**, 2621-2629.

- van den Heuvel, S.J.L., van Laar, T., The, I. und van der Eb, A.J. (1993) Large E1B proteins of adenovirus types 5 and 12 have different effects on p53 and distinct roles in cell transformation. *J. Virol.*, **67**, 5226-5234.
- Wang, J., Shiels, C., Sasieni, P., Wu, P.J., Islam, S.A., Freemont, P.S. und Sheer, D. (2004) Promyelocytic leukemia nuclear bodies associate with transcriptionally active genomic regions. *J. Cell Biol.*, **164**, 515-526.
- Wei, X., Yu, Z.K., Ramalingam, A., Grossman, S.R., Yu, J.H., Bloch, D.B. und Maki, C.G. (2003) Physical and functional interactions between PML and MDM2. *J Biol Chem*, **278**, 29288-29297.
- Weiden, M.D. und Ginsberg, H.S. (1994) Deletion of the E4 region of the genome produces adenovirus DNA concatemers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 153-157.
- White, E. (1995) Regulation of p53-dependent apoptosis by E1A and E1B. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **199**, 34-58.
- White, E. (1996) Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev*, **10**, 1-15.
- White, E. (1998) Regulation of apoptosis by adenovirus E1A and E1B oncoproteins. *Semin Virol*, **8**, 505-513.
- Whittaker, J.L., Byrd, P.J., Grand, R.J. und Gallimore, P.H. (1984) Isolation and characterization of four adenovirus type 12-transformed human embryo kidney cell lines. *Mol Cell Biol*, **4**, 110-116.
- Wickham, T.J., Filardo, E.J., Cheresch, D.A. und Nemerow, G.R. (1994) Integrin alpha v beta 5 selectively promotes adenovirus mediated cell membrane permeabilization. *J Cell Biol*, **127**, 257-264.
- Wickham, T.J., Mathias, P., Cheresch, D.A. und Nemerow, G.R. (1993) Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, **73**, 309-319.
- Wienzek, S., Roth, J. und 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. und 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**, 149-175.
- Wojcik, C. und DeMartino, G.N. (2003) Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol*, **35**, 579-589.

- Wold, W.S., Mackey, J.K., Rigden, P. und Green, M. (1979) Analysis of human cancer DNA's for DNA sequence of human adenovirus serotypes 3, 7, 11, 14, 16, and 21 in group B1. *Cancer Res*, **39**, 3479-3484.
- Wu, G., Jiang, X., Lee, W.H. und Chen, P.L. (2003) Assembly of functional ALT-associated promyelocytic leukemia bodies requires Nijmegen Breakage Syndrome 1. *Cancer Res*, **63**, 2589-2595.
- Wu, G., Lee, W.H. und Chen, P.L. (2000) NBS1 and TRF1 colocalize at promyelocytic leukemia bodies during late S/G2 phases in immortalized telomerase-negative cells. Implication of NBS1 in alternative lengthening of telomeres. *J Biol Chem*, **275**, 30618-30622.
- Wu, X., Avni, D., Chiba, T., Yan, F., Zhao, Q., Lin, Y., Heng, H. und Livingston, D. (2004) SV40 T antigen interacts with Nbs1 to disrupt DNA replication control. *Genes Dev*, **18**, 1305-1316.
- Xie, K., Lambie, E.J. und Snyder, M. (1993) Nuclear dot antigens may specify transcriptional domains in the nucleus. *Mol Cell Biol*, **13**, 6170-6179.
- Yeager, T.R., Neumann, A.A., Englezou, A., Huschtscha, L.I., Noble, J.R. und Reddel, R.R. (1999) Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res*, **59**, 4175-4179.
- Yew, P.R. und 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. und 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. und Berk, A.J. (1994) Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. *Genes Dev.*, **8**, 190-202.
- Zantema, A., Fransen, J.A., Davis, O.A., Ramaekers, F.C., Vooijs, G.P., DeLeys, B. und van der Eb, A.J. (1985a) 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, O.A., van Laar, T., Vaessen, R.T. und van der Eb, A.J. (1985b) Adenovirus serotype determines association and localization of the large E1B tumor antigen with cellular tumor antigen p53 in transformed cells. *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 3084-3091.

- Zeller, T. (2004) In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen funktioneller Bereiche des Adenovirus Typ 5 E1B-55kDa-Proteins. Dissertation. *Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene*. Universität Regensburg.
- Zhao, L.Y., Colosimo, A.L., Liu, Y., Wan, Y. und Liao, D. (2003) Adenovirus E1B 55-kilodalton oncoprotein binds to Daxx and eliminates enhancement of p53-dependent transcription by Daxx. *J. Virol.*, **77**, 11809-11821.
- Zhao, L.Y. und Liao, D. (2003) Sequestration of p53 in the cytoplasm by adenovirus type 12 E1B 55-kilodalton oncoprotein is required for inhibition of p53-mediated apoptosis. *J. Virol.*, **77**, 13171-13181.
- Zhong, S., Muller, S., Ronchetti, S., Freemont, P.S., Dejean, A. und Pandolfi, P.P. (2000) Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood*, **95**, 2748-2752.

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Endter, C.*, Härtl, B.*, Spruss, T., Hauber, J. und Dobner, T. (2005) Blockage of CRM1-dependent nuclear export of the adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa protein augments oncogenic transformation of primary rat cells. *Oncogene*, **24**, 55-64.
*= contributed equally.

Vorträge bei Fachtagungen

Härtl, B., Zeller, T., Kirchner, S. und Dobner T.: Effects of mutations in the adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa protein (E1B-55kDa) coding sequence on transformation of primary rat cells. *Small DNA Tumor Viruses Meeting*, Madison/USA, 13.-18. Juli 2004.

Härtl, B., Zeller, T., Kirchner, S. und Dobner T.: Binding of the adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa oncoprotein to cellular Mre11 is required for efficient transformation of primary rat cells. *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie*, Hannover, 16.-19. März 2005.

Härtl, B., Zeller, T., Kirchner, S. und Dobner T.: Binding of the adenovirus type 5 early region 1B 55K oncoprotein to cellular Mre11 is required for efficient transformation of primary rat cells. *Small DNA Tumor Viruses Meeting*, Cambridge/England, 19.-24. Juli 2005.

Posterpräsentationen bei Fachtagungen

Härtl, B., Kremmer, E. und Dobner T.: Generation and characterization of novel monoclonal antibodies specific for the human adenovirus type 5 E1B-55kDa protein. *Small DNA Tumor Viruses Meeting*, Madison/USA, 9.-14. Juli 2002.

Härtl, B., Endter, C., Hauber, J. und Dobner T.: Cytoplasmic sequestration of p53 in transformed rat cells is independent from CRM1-dependent nuclear export of the adenovirus type 5 E1B-55kDa protein. *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie*, Tübingen, 17.-20. März 2004.

Härtl, B., Endter, C., Hauber, J. und Dobner T.: Blockage of CRM1-dependent nuclear export of the adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa protein augments oncogenic transformation in primary rat cells. *Small DNA Tumor Viruses Meeting*, Madison/USA, 13.-18. Juli 2004.

Härtl, B., Sieber, T., Hauber, J. und Dobner T.: Cytoplasmic sequestration of p53 in transformed rat cells is independent from CRM1-dependent nuclear export of the adenovirus type 5 E1B-55kDa protein. *Small DNA Tumor Viruses Meeting*, Madison/USA, 13.-18. Juli 2004.

Danksagung

Die praktischen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden zwischen Oktober 2000 und Juni 2005 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Hans Wolf danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. Eggehard Holler danke ich vielfach für die Bereitschaft zur Übernahme des Erstgutachtens.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Thomas Dobner für seine Anleitung, Motivation und tatkräftige Unterstützung dieser Arbeit und sein unermüdliches Engagement, das sehr zum Gelingen beigetragen hat.

Allen ehemaligen und aktuellen „Dicken Dobners“ danke ich für die gute Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und die Kämpfe am Schokoschub. Dagi, Peter und Sylwia danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft im Laboralltag. Den „Zickenzwinger-Mädels“ Birgitt, Kathrin, Marie-Sophie, Marie-Joelle, Paola, Roland und Sabrina danke ich für die lustige und schöne Zeit auch außerhalb des Labors.

Mein besonderer Dank gilt Kathrin Kindsmüller für das Korrekturlesen dieser Arbeit und ihre unglaubliche Hilfsbereitschaft bei zahlreichen Problemen.

Herrn Dr. Thilo Spruss möchte ich für die permanente Bereitstellung von Ratten und Nacktmäusen danken. In diesem Zusammenhang danke ich auch besonders Herrn Franz Wiesenmeyer und Herrn Oskar Baumann für die hervorragende Assistenz.

Frau Dr. Elisabeth Kremmer danke ich für die Hilfe bei der Herstellung von diversen Antikörpern.

Ein ganz besonderer Dank richtet sich an meine Eltern und meine Brüder Johannes, Josef und Bernhard ohne deren Unterstützung und Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.