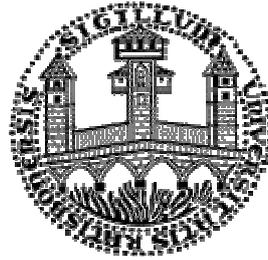


In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen
funktioneller Bereiche des Adenovirus Typ 5
E4ORF3-Proteins



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

vorgelegt von
Tanja Lucas
aus
Weiden/ Oberpfalz
November 2005

Die vorliegende Arbeit wurde selbständig
und ohne unzulässige Hilfe angefertigt.

Tanja Lucas

Promotionsgesuch eingereicht am: 30. November 2005

Diese Arbeit wurde angeleitet von:

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

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Rosemarie Baumann (Vorsitzende)

Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer (1. Prüfer, Erstgutachter)

PD Dr. Thomas Dobner (2. Prüfer, Zweitgutachter)

Prof. Dr. Herbert Tschochner (3. Prüfer)

"The world could be changed by the subtlest of actions."

Eliot Pattison (Beautiful Ghosts)

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

VERZEICHNIS DER IM TEXT VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	1
ZUSAMMENFASSUNG	3
A EINLEITUNG	5
A.1 Die Bedeutung der Adenoviren in der Gentherapie	6
A.2 Produktiver Infektionszyklus	7
A.3 Transformation und Onkogenität humaner Adenoviren	8
A.3.1 Onkogenes Potenzial humaner Adenoviren	8
A.3.2 Transformation von primären Zellen in Kultur	9
A.4 Rolle adenoviraler Onkoproteine bei der Transformation	10
A.4.1 Die E1-Region und die klassische Transformation	10
A.4.2 Die E4-Region	12
A.4.3 Die E4-Region und die Hypertransformation	13
A.4.4 Die E4-Region und die „hit & run“-Transformation	14
A.5 Zusammensetzung der subnukleären PML NBs	16
A.6 Virus-induzierte Modifizierung der PML NBs	19
A.7 Funktionen und Struktur von p300/CBP	21
A.8 Regulation von p300/CBP durch virale Onkoproteine	25
A.9 Regulation der p53-Funktionen durch adenovirale Onkoproteine	27
A.10 Zielsetzung und Aufgabenstellung dieser Arbeit	30
B MATERIAL UND METHODEN	31
B.1 Bakterienstämme und Nährmedien	31
B.1.1 Bakterienstämme	31
B.1.2 Nährmedien	32
B.2 Expressionsvektoren	32
B.3 Allgemeine und standardisierte DNA-Klonierungstechniken	33
B.3.1 Enzymatische Spaltung von Nukleinsäuren mit Restriktionsenzymen	33
B.3.2 Agarose-Gelelektrophorese	33
B.3.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	34
B.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten	34
B.3.5 Transformation von <i>E. coli</i>	34
B.3.5.1 Rubidiumchlorid-Methode	34
B.3.5.2 Elektroporation	35
B.3.6 Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	36

B.4	PCR (<i>polymerase chain reaction</i>)	36
B.4.1	Standard-PCR	36
B.4.2	Zielgerichtete In-vitro-Mutagenese mittels PCR	37
B.5	Oligonukleotide	39
B.6	DNA-Sequenzierung	39
B.7	Eukaryontische Zelllinien und Nährmedien	42
B.7.1	Eukaryontische Zelllinien	42
B.7.2	Kulturbedingungen für eukaryontische Zellen	42
B.8	Gewinnung und Kultivierung primärer Rattennierenzellen	43
B.9	Transfektion von adhärenenten Eukaryontenzellen	43
B.9.1	Transfektion mittels CaHPO ₄ -Präzipitation	43
B.9.2	Transfektion mittels Liposomen-Methode	44
B.9.3	Transfektion mittels Elektroporation	45
B.10	Adenoviren	46
B.10.1	Gewinnung von Virus aus Bacmid-DNA	46
B.10.2	Herstellung und Lagerung von hochkonzentrierten Virusbeständen	46
B.10.3	Titerbestimmung von Virusbeständen	47
B.10.4	Isolierung adenoviraler DNA aus gereinigten Viruspartikeln	49
B.10.5	Infektion von Säugerzellen mit Adenoviren	49
B.11	Ernte und Aufarbeitung der Zellen nach Transfektion und Infektion	50
B.12	Qualitative Analyse von zellulären und viralen Proteinen	51
B.13	Auftrennung von Proteinen mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	51
B.14	Detektion spezifischer Proteine mit Hilfe der <i>Western Blot</i>-Analyse	52
B.14.1	Proteintransfer auf Nitrozellulose: <i>Western Blot</i> -Analyse	52
B.14.2	Detektion über eine Enzym/Substrat-vermittelte Chemilumineszenz	52
B.15	Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen mittels Koimmunpräzipitation	54
B.16	Immunfluoreszenz-Analysen	55
B.17	Transformation primärer Rattennierenzellen	56
B.18	Analyse des mutagenen Potenzials verschiedener E4ORF3-Proteine	57
B.19	Bestimmung der endogenen Histonazetyltransferase-Aktivität	58
C	ERGEBNISSE	60
C.1	Identifizierung funktioneller Bereiche des Ad5 E4ORF3-Proteins mittels Mutationsanalysen	61
C.2	Konstruktion von E4ORF3-Varianten	65
C.3	Expression von E4ORF3-Varianten	65
C.4	Phosphorylierung von Ad5 E4ORF3 <i>in vivo</i>	66
C.5	Lokalisation von E4ORF3-Varianten in H1299-Zellen	69
C.6	Interaktion von E4ORF3 mit PML NB-Strukturen	74

C.7	PML ist nicht notwendig für die Ausbildung typischer, elongierter E4ORF3-Strukturen	79
C.8	E4ORF3 hat keinen Einfluss auf die Gleichgewichtsmengen von verschiedenen PML-Isoformen	81
C.9	Zusammenfassung (I): E4ORF3 und PML NBs	83
C.10	Interaktion von E4ORF3 mit PML NB-Komponenten	84
C.11	Interaktion von Ad5 E4ORF3-Varianten mit p300	85
C.11.1	Ad5 E4ORF3-Varianten interagieren mit p300 <i>in vivo</i>	85
C.11.2	Kokalisation von Ad5 E4ORF3 und p300 in BRK1-Zellen	88
C.12	Einfluss von p300 auf die Ausbildung E4ORF3-spezifischer Strukturen in MEF-Zellen	93
C.13	Einfluss von E4ORF3 auf endogene Histonazetyltransferasen	96
C.14	Azetylierung von Ad5 E4ORF3 <i>in vivo</i>	99
C.15	Bindung von Ad5 E4ORF3 an Tumorsuppressor p53 <i>in vivo</i>	101
C.16	Zusammenfassung (II): E4ORF3 und p300	103
C.17	Analysen des transformierenden Potenzials von E4ORF3-Varianten	104
C.17.1	Analyse des transformierenden Potenzials von E4ORF3-Varianten in Kooperation mit E1	105
C.17.2	Analyse des transformierenden Potenzials von E4ORF3-Varianten in Kooperation mit E1A	107
C.18	Bestimmung des mutagenen Potenzials ausgewählter E4ORF3-Varianten	108
C.19	Zusammenfassung (III): E4ORF3 und die Transformation	110
C.20	Untersuchung ausgewählter Ad5 E4ORF3-Varianten im Kontext der Virusinfektion	112
C.20.1	Klonierungssystem zur gezielten Herstellung von Adenovirusvarianten	112
C.20.2	Charakterisierung der Ad5 E4ORF3-Virusmutanten	114
C.20.3	Lokalisation von E4ORF3 in infizierten A549-Zellen	116
C.20.4	Einfluss von PML NB-Komponenten auf die E4ORF3-Strukturen in infizierten MEF-Zellen	119
C.21	Zusammenfassung (IV): E4ORF3 im viralen Kontext	121
D	DISKUSSION	122
D.1	PML-unabhängige Funktionen von E4ORF3	123
D.2	Interaktion von E4ORF3 und p300 <i>in vivo</i>	125
D.3	Negativer Effekt von E4ORF3 auf die Histonazetylierung	128
D.4	Azetylierung von E4ORF3 an Lysin⁸	134
D.5	Azetylierung von p53 durch E4ORF3	135
D.6	Funktionen von E4ORF3 während der lytischen Infektion	140
D.7	Mechanismen der Ad5 E4ORF3-vermittelten Transformation	146
D.8	Ausblick	150
	LITERATURVERZEICHNIS	153

Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

AK	Antikörper
APL	Akute promyelozytische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
BR	Bromodomäne
BRK	Rattennierenzellen (<i>baby rat kidney cells</i>)
BSA	Rinderserum-Albumin (<i>bovine serum albumine</i>)
CBP	CREB (<i>cAMP responsive element binding protein</i>)-bindendes Protein
CH1/CH3	Cystein-Histidin-reiches Zinkfingermotiv
CR1, 2, 3	Konservierte Region (<i>conserved region</i>) 1, 2, 3
dam	Methylierungsdefekt in <i>Escherichia coli</i> (dam-Methylase)
DAPI	4', 6 Diamidino-2-Phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DTT	Dithiothreitol
E1, 2, 3, 4	Frühe Region (<i>early region</i>) 1, 2, 3, 4
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure (Titriplex III)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>et al.</i>	und andere
ffu	Fluoreszenz-formende Einheiten (<i>fluorescent-forming units</i>)
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
FKS	Fötale Kälberserum
HA	Hämagglutinin-Epitop von Influenza
HAT	Histonazetyltransferase
HCMV	Humanes Zytomegalievirus
HDAC	Histondeazetyltransferase
HeBS	HEPES-gepufferte Kochsalzlösung
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horse-radish peroxidase</i>)
IBiD	<i>interferon-binding domain</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IHD	<i>IBiD homology domain</i>
IP	Immunpräzipitation
L1, 2, 3, 4, 5	Späte Region (<i>late region</i>) 1, 2, 3, 4, 5
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (<i>major-histocompatibility complex</i>)
MLP	<i>major late promotor</i>

MLTU	<i>major late transcription unit</i>
MOPS	3-N-Morpholoninopropansulfonsäure
mu	<i>map unit</i> (1 mu = 360 nt)
MW	Molekulargewicht
NB	Zellkernkörper (<i>nuclear body</i>)
ND10	Zellkerndomänen (<i>nuclear domains</i>) 10
NES	nukleäres Exportsignal
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
orf	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
ori	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
pfu	Plaque-bildende Einheiten (<i>plaque-forming units</i>)
p.i.	nach Infektion (<i>post infection</i>)
PML	Protein der promyelozytischen Leukämie
POD	PML onkogene Domäne (<i>oncogenic domain</i>)
pol	Polymerase (Enzymfunktionen)
poly(A)	Kurzbezeichnung für polyadenyliertes 3'-Ende von RNA-Transkripten
PP2A	Proteinphosphatase 2A
Rb	Retinoblastom-Tumorsuppressorprotein
Upm	Umdrehungen pro Minute
RAR α	Retinsäure-Rezeptor α
RT	Raumtemperatur
SAP	Alkalische Phosphatase aus Garnelen (<i>shrimp alkaline phosphatase</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SUMO	Kleines Ubiquitin-modifizierendes Protein (<i>small ubiquitin modifier</i>)
SV40	Affenvirus (<i>simian virus</i>) 40
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAg	Großes Tumor-Antigen von SV40
Taq	DNA-abhängige DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TP	Terminales Protein
TPL	Dreiteilige Promotorsequenz (<i>tripartite leader</i>)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TTBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
U	Enzymeinheit (<i>Unit</i>)
ÜN	über Nacht
VA RNA	Virus-assoziierte (<i>virus-associated</i>) RNA
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
WB	<i>Western Blot</i>
Wt	Wildtyp
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit (<i>weight per volume</i>)
x g	x-fache Erdbeschleunigung

Zusammenfassung

Die als PML NBs bezeichneten Zellkerndomänen sind in den letzten Jahren in den Mittelpunkt der virologischen Grundlagenforschung gerückt, da sie vermutlich im Replikationszyklus vieler Viren eine wichtige Funktion einnehmen. Diese Matrix-assoziierten Strukturen enthalten eine Vielzahl unterschiedlichster Proteine, die an den Vorgängen der Transkription, Apoptose, Zellzykluskontrolle und DNA-Reparatur maßgeblich beteiligt sind. Ferner spielen sie eine wichtige Rolle in virusinduzierten Transformationsvorgängen, da alle bislang bekannten DNA-Tumorviren ein oder mehrere Proteine besitzen, welche die Strukturen dieser nukleären PML NB-Domänen modulieren. Bei humanen Adenoviren (Ad) ist das Onkoprotein ORF3 der frühen Region 4 (E4ORF3) für die Modulation von PML NBs verantwortlich. E4ORF3 bewirkt dabei die Reorganisation der PML NBs in fibrilläre Strukturen, die E4ORF3 und verschiedene zelluläre Komponenten dieser PML NBs (z.B. p53, p300 und PML) enthalten. Die molekularen Mechanismen, die der E4ORF3-induzierten Umstrukturierung der PML NBs zu Grunde liegen, sowie die Konsequenzen, die sich daraus für die Ad-induzierte Zelltransformation ergeben, sind nach wie vor unklar.

In der vorliegenden Arbeit wurden strukturelle und funktionelle Analysen zur E4ORF3-induzierten Modulation von PML NBs durchgeführt. Primäres Ziel dieser Untersuchungen war es, wichtige Bereiche und zelluläre Interaktionspartner des E4ORF3-Proteins zu identifizieren, die für die Reorganisation der PML NB-Kerndomänen und die Ausbildung fibrillärer E4ORF3-Strukturen verantwortlich sind. Dadurch sollte unter anderem die Frage beantwortet werden, ob die Modulation von PML NBs im Zusammenhang mit den transformierenden Eigenschaften des Ad-Proteins steht. Mit Hilfe immunhistochemischer Analysen konnten drei Gruppen von E4ORF3-Mutanten identifiziert werden. Die erste Gruppe umfasst Mutanten, die PML NBs reorganisieren und mit diesen Strukturen kolokalisieren. Zur zweiten Gruppe zählen E4ORF3-Polypeptide, die zwar mit PML NBs kolokalisieren, aber nicht in der Lage sind, diese subnukleären Strukturen zu modulieren. Die dritte Gruppe beinhaltet E4ORF3-Mutanten, die nicht mit PML NBs assoziieren und keine Reorganisation

der Zellkerndomänen induzieren. Während Mutationen der Gruppen 1 und 3 einen negativen Einfluss auf die Zelltransformation haben bewirken Aminosäureaustausche in der zweiten Gruppe eine signifikante Erhöhung der Transformationsrate primärer Zellen. Das transformierende Potenzial von E4ORF3 steht somit in direktem Zusammenhang, an Komponenten von PML NBs zu binden und ist scheinbar unabhängig von seiner Eigenschaft elongierte Strukturen im Zellkern auszubilden. Funktionelle Untersuchungen zeigen, dass diese Aktivität direkt über den zellulären Transkriptionskoaktivator p300 vermittelt wird, der bekanntermaßen *in vitro* und *in vivo* mit dem E4-Protein interagiert. Die Histonazetyltransferase (HAT) p300 bewirkt dabei die nukleäre Retention des viralen Polypeptids und fördert somit direkt oder indirekt die Ausbildung fibrillärer Kernstrukturen, die E4ORF3, p300 und andere noch unbekannte zelluläre Kernproteine enthalten.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden funktionelle Analysen durchgeführt, um zu überprüfen, ob E4ORF3 möglicherweise die Histonazetyltransferase-Aktivität von p300 moduliert. Mit Hilfe eines In-vitro-Histonazetylierungs-Testsystems konnte gezeigt werden, dass E4ORF3 einen negativen Effekt auf die Azetylierung von Histonen durch endogene HAT-Enzyme besitzt und dabei selbst azetyliert wird. Dies lässt vermuten, dass E4ORF3 die HAT-Aktivität von p300 direkt beeinflusst. Nach einem einfachen Modell könnte E4ORF3 die Auflockerung der Chromatinstruktur blockieren und dadurch zelluläre und/oder virale Transkriptionsprozesse inhibieren. Dafür spricht auch die erstmalige Beobachtung, dass E4ORF3 an p53 bindet und posttranslational die Azetylierung des Tumorsuppressorproteins und damit die Aktivierung p53-stimulierter Transkription reprimiert.

Im Ganzen unterstützen diese Ergebnisse die Vorstellung, dass die transformierenden Eigenschaften von E4ORF3 zumindest teilweise über die Interaktion mit den PML NBs und verschiedenen Komponenten der PML NBs vermittelt werden. An erster Stelle stehen dabei die Tumorsuppressorproteine p53 und p300. Auf molekularer Ebene agiert E4ORF3 dabei vermutlich als ein viraler Transkriptionsrepressor, der posttranslational über Wechselwirkung mit p300 die Azetylierung von Histonen und Nicht-Histon-Proteinen (z.B. p53) inhibiert. Da alle bislang bekannten viralen Onkoproteine der DNA-Tumoviren die Funktion von PML NBs verändern, beschreibt die E4ORF3-vermittelte Modulation von PML NBs und p53 über p300 einen neuartigen, vermutlich allgemeingültigen Wirkmechanismus Virus-vermittelter Onkogenese.

A Einleitung

Adenoviren, die zur Familie der *Adenoviridae* zählen, wurden erstmals Mitte des letzten Jahrhunderts aus adenoidem Gewebe und dem Rachensekret respiratorisch erkrankter Personen isoliert (Rowe *et al.*, 1953; Hilleman und Werner, 1954). Die Adenoviren des Menschen verursachen sowohl lytische als auch persistierende Infektionen. Diese sind mit einer Vielzahl klinischer Symptome assoziiert und führen in der Hauptsache zu Erkrankungen des Respirations-, Gastrointestinaltraktes und der Bindehaut des Auges (zur Übersicht: Horwitz, 1996). Basierend auf der Onkogenität im Versuchstier und einer Reihe weiterer Kriterien (Hämagglutination, GC-Gehalt und Sequenzhomologien der viralen DNA) werden humane Adenoviren in sechs Untergruppen (A bis F) eingeteilt (zur Übersicht: Graham, 1984; Shenk, 1996; Modrow und Falke, 1997; Shenk, 2001). Zu den bis heute am ausführlichsten untersuchten Vertretern der humanen Adenoviren gehören die beiden nah verwandten Serotypen 2 und 5 (Ad2 und Ad5) der Untergruppe C (Abb.A.1).

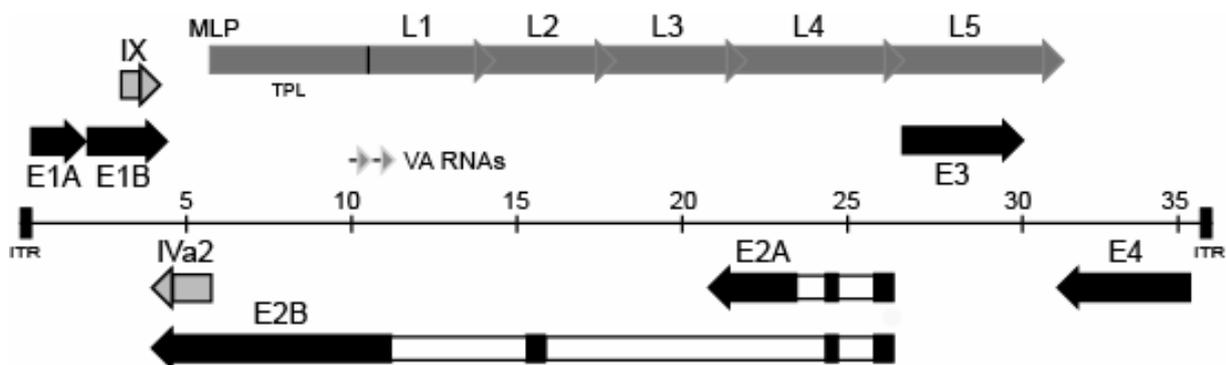


Abb.A.1: Die Genomorganisation von Adenovirus Serotyp 5

Dargestellt ist die Lage der frühen (E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, IX, und IVa2) und der späten (MLTU) Transkriptionseinheiten. 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 dem gemeinsamen Promotor (MLP) aus transkribiert und kodieren hauptsächlich für Strukturproteine. Die Genprodukte der frühen Transkriptionseinheiten sind bereits vor der DNA-Synthese aktiv und besitzen regulatorische Funktionen hinsichtlich der DNA-Replikation (E2), Modulation des Immunsystems (E3) sowie Transkription, RNA-Prozessierung und Zellzyklus-Kontrolle (E1A, E1B und E4). MLP: *major late promoter*; TPL: *tripartite leader*; VA RNAs: *virus-associated RNAs*; ITR: *inverted terminal repeat*.

A.1 Die Bedeutung der Adenoviren in der Gentherapie

Lange Zeit stellten in der Grundlagenforschung Adenoviren ein geeignetes Modellsystem für verschiedene molekular- und zellbiologische Fragestellungen dar. So wurde mit Hilfe von Adenoviren das erste Mal das Prinzip des Spleißens von Vorläufer-RNA-Transkripten entdeckt, das später auch auf eukaryontische Zellen übertragen werden konnte (Berget und Sharp, 1977; Chow *et al.*, 1977).

Im letzten Jahrzehnt jedoch rückte die Verwendung humaner Adenoviren als Vektorsysteme zur Behandlung von Tumorerkrankungen und somatischen Gendefekten in den Mittelpunkt des Interesses. Aufgrund ihrer einfachen Vermehrung in Gewebekultur, ihres breiten Zell-tropismus und ihrer hohen Transduktionsrate humaner Zellen wurde bereits Ende der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts der Einsatz von Adenoviren in der Gentherapie diskutiert (Yaniv, 1979). Heutzutage besitzen von Adenovirus abgeleitete Vektoren neben retroviralen Vektoren viel versprechende Eigenschaften für ihren Einsatz in der Gentherapie. Grundsätzlich lassen sich adenovirale Vektoren in zwei unterschiedliche Kategorien einteilen, je nachdem, ob die kodierende Sequenz teilweise oder komplett entfernt worden ist. Die erste Generation replikationsdefekter Adenovirus-Vektoren weisen Deletionen der frühen E1- und/oder E3-Region auf (zur Übersicht: Russel, 2000). Mit der Entwicklung der zweiten Generation von Vektoren, denen zusätzlich die E4-Region fehlen, kann zwar das Problem der Toxizität und Immunität verringert werden (Gao *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997; Lusky *et al.*, 1998; O'Neal *et al.*, 1998; Christ *et al.*, 2000; Rafii *et al.*, 2001), aber die Daten zur Persistenz des Transgens blieben widersprüchlich (Gao *et al.*, 1996; Armentano *et al.*, 1997; Brough *et al.*, 1997; Dedieu *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997; Grave *et al.*, 2000).

In der dritten Generation der Adenovirus-Vektoren ist die gesamte kodierende Virussequenz deletiert und kann deshalb durch große Fremd-DNA-Fragmente (>30kbp) ersetzt werden (zur Übersicht: Kochanek *et al.*, 1996). Die nachfolgende Entwicklung von replikations-kompetenten Vektoren zielte auf die Behandlung von Tumoren ab. Diese Viren sind aufgrund genetischer Veränderungen in den Kontroll- und/oder kodierenden Regionen der E1-Transkriptionseinheit scheinbar in der Lage, selektiv in bestimmten Tumorzelltypen zu replizieren (zur Übersicht: Alemany *et al.*, 2000; Gomez-Navarro und Curiel, 2000). Der bekannteste Vertreter dieser Kategorie ist dl1520 alias ONYX-015, der einen Defekt in der E1B-Region aufweist (Barker und Berk, 1987; Bischoff *et al.*, 1996). Die genaue Klärung der molekularen Grundlagen für die spezifische Virusvermehrung in Tumoren und die Entwicklung weiterer Vektoren ist momentan das Ziel der derzeitigen Forschung. Onkolytische

Vektoren stellen daher ein viel versprechendes Konzept zur Behandlung von Tumorerkrankungen dar (zur Übersicht: Alemany *et al.*, 2000).

A.2 Produktiver Infektionszyklus

Humane Adenoviren infizieren *in vivo* ein großes Spektrum unterschiedlicher Zelltypen. Bevorzugte Zielzellen sind jedoch vor allem postmitotisch ruhende Epithelzellen des Hals-, Nasen-, Rachenraumes, der Lunge und des Verdauungstraktes. 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 (Shenk, 2001).

Der produktive Infektionszyklus wird laut Definition in eine frühe und eine späte Phase unterteilt.

In der frühen Phase erfolgt nach Adsorption und Penetration des Virus zunächst der Kernimport des viralen DNA-Protein-Komplexes. Anschließend werden in einer zeitlich koordinierten Reihenfolge mehr als 20 regulatorische Proteine der frühen Transkriptionseinheiten E1A, E1B, E2, E3 und E4 hergestellt. Das Ziel der entsprechenden Genprodukte ist die Schaffung optimaler Bedingungen für die virale DNA-Synthese und die Produktion viraler Strukturproteine in der späten Phase der Infektion.

Proteine der E1-Region induzieren die Zellzyklusprogression (E1A und E1B) und wirken den antiviralen Schutzmechanismen der Zelle entgegen (E1B). Die frühe Transkriptionseinheit E2 kodiert für Proteine, die für die Replikation viraler DNA notwendig sind. Die Proteine der E3-Region hingegen besitzen hauptsächlich immunmodulatorische Funktionen und erschweren dadurch das Erkennen von Virus-infizierten Zellen durch das Immunsystem (Gooding und Wold, 1990; Mathews und Shenk, 1991; Burgert und Blusch, 2000; Horwitz, 2001).

Mit dem Einsetzen der viralen DNA-Replikation beginnt die späte Phase des lytischen Infektionszyklus. Sie ist gekennzeichnet durch die Expression der späten viralen Genprodukte der späten Transkriptionseinheit (MLTU, *major late transcription unit*), das selektive Abschalten der zellulären Proteinsynthese (*host shutoff*) und den Zusammenbau der Virionen. Schließlich endet der produktive Vermehrungszyklus mit der Freisetzung intakter Viruspartikel nach Lyse der Wirtszelle (zur Übersicht: Shenk, 2001).

A.3 Transformation und Onkogenität humaner Adenoviren

Die letzten 40 Jahre molekularbiologischer Untersuchungen an humanen Adenoviren haben sehr viel zum Verständnis der grundlegenden Prinzipien des normalen und malignem Zellwachstums beigetragen. Erste Beobachtungen des karzinogenen Potenzials humaner Adenoviren führten zu entscheidenden Einblicken in die molekularen Mechanismen der Entstehung von Tumoren und etablierten Adenoviren als Modellsystem zur Klärung Virus-vermittelter Transformationsprozesse.

A.3.1 Onkogenes Potenzial humaner Adenoviren

Bis heute konnte kein Zusammenhang zwischen der Entstehung menschlicher Tumorerkrankungen und humanen Adenoviren hergestellt werden (Mackey *et al.*, 1976; Wold *et al.*, 1978; Mackey *et al.*, 1979; Chauvin *et al.*, 1990). Nichtsdestotrotz zeigten bereits 1962 Trentin und Mitarbeiter, dass Adenovirus Serotyp 12 (Ad12) als erstes humanpathogenes Virus onkogene Eigenschaften in neugeborenen Hamstern aufweist (Trentin *et al.*, 1962). In weiteren Arbeiten konnte jedoch nur für bestimmte Serotypen (12, 18, 31) ein onkogenes Potenzial nachgewiesen werden (zur Übersicht: Graham, 1984). Verschiedene Serotypen wurden somit, abhängig von der Effizienz und Latenzzeit der Tumorinduktion, als nicht onkogen, schwach onkogen oder hoch onkogen eingestuft (Tab.A.1).

Onkogenität	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	1, 2, 5, 6	keine Tumoren
	D	8, 13, 15, 17, 19, 20, 22 bis 30, 32, 33, 36 bis 39, 42 bis 49	
	E	4	
	F	40, 41	

Tab.A.1: Die Einteilung humaner Adenoviren bezüglich ihrer Onkogenität in Nagetieren

Als hoch onkogen gelten Viren, die mit sehr großer Effizienz und kurzer Latenzzeit Tumoren in nicht-permissiven Nagetieren induzieren. Virustypen werden hingegen als schwach onkogen eingestuft, wenn eine Tumorinduktion nur unregelmäßig und mit langen Inkubationszeiten beobachtet werden kann. Viren der Subgruppe D sind generell nicht onkogen. Einzige Ausnahme bilden die Serotypen 9 und 10, welche östrogenabhängige Mammakarzinome in weiblichen Ratten induzieren (Ankerst *et al.*, 1974a; Ankerst *et al.*, 1974b; Jonsson und Ankerst, 1977; Ankerst und Jonsson, 1989; Javier *et al.*, 1991).

A.3.2 Transformation von primären Zellen in Kultur

Ungeachtet ihres Potenzials, Tumoren in Nagetieren zu erzeugen, sind sowohl onkogene als auch nicht onkogene Adenoviren in der Lage, primäre Zellen in Kultur zu transformieren. Dabei werden die transformierten Zellen morphologisch so verändert, dass sie als dichte und vielschichtige Kolonien (*Foci*) auswachsen und verschiedene phänotypische Merkmale onkogener Transformation aufweisen. Es können jedoch nicht alle dieser transformierten Zelllinien nach Inokulation in Nagetiere Tumoren erzeugen. Im Gegensatz zu Ad12-transformierten Zellen, die in syngenen, immunkompetenten Ratten Tumoren bilden, können Ad2- oder Ad5-transformierte Rattenzellen lediglich in thymusdefizienten Nacktmäusen Tumoren induzieren (Bernards *et al.*, 1983).

Trotz ihres onkogenen Potenzials konnte bisher kein Zusammenhang zwischen Adenoviren und der Tumorentstehung beim Menschen gefunden werden. Die Tatsache, dass es kaum gelang, humane Zellen mit Adenovirus zu transformieren, legte die Vermutung nahe, dass eine abortive Infektion eine wichtige Voraussetzung für die hocheffiziente Transformation von Nagerzellen darstellt. Interessanterweise jedoch ist die Transformation humaner Zellen mit nicht-infektiösen, subgenomischen, viralen DNA-Fragmenten im Vergleich zu Nagerzellen ebenfalls außerordentlich ineffizient. Denn bislang konnten nur wenige humane Zellen erfolgreich mit Ad12- oder Ad5-DNA-Fragmenten transformiert werden. Bei diesen Zellen handelt es sich zumeist um embryonale Zellen (Graham *et al.*, 1977; Byrd *et al.*, 1982; Whittaker *et al.*, 1984; Gallimore *et al.*, 1986; van den Heuvel *et al.*, 1992; Fallaux *et al.*, 1996; Fallaux *et al.*, 1998) und Amniozyten (Schiedner *et al.*, 2000). Die Unterschiede in der Permissivität von humanen und Nagetierzellen bieten daher keine vollständige Erklärung für die unterschiedlichen Transformationseffizienzen. 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).

A.4 Rolle adenoviraler Onkoproteine bei der Transformation

A.4.1 Die E1-Region und die klassische Transformation

Die meisten Adenovirus-induzierten Tumoren, Tumorzelllinien und transformierten Zellen zeichnen sich durch die Integration der viralen DNA und die Expression von Virus-spezifischen Genprodukten aus. Dementsprechend folgt die adenovirale Transformation dem klassischen Konzept der viralen Onkogenese, welches auf der Persistenz der viralen Gene in transformierten Zellen beruht (zur Übersicht: Graham, 1984). Das onkogene Potenzial humaner Adenoviren wird traditionell der E1-Region zugeschrieben (zur Übersicht: Tooze, 1981; Graham, 1984), da in Virus-transformierten Zellen die *E1*-Gene konsistent persistieren und die Expression der E1-Proteine nach Transfektion zu einer onkogenen Transformation führt. Diese Region, die am linken Ende des adenoviralen Genoms lokalisiert ist (Abb.A.2) und für die Genprodukte der E1A- und E1B-Transkriptionseinheiten kodiert, ist daher für eine vollständige morphologische Transformation ausreichend (zur Übersicht: Bernards und Van der Eb, 1984; Graham, 1984; Shenk, 2001; Endter und Dobner, 2004).

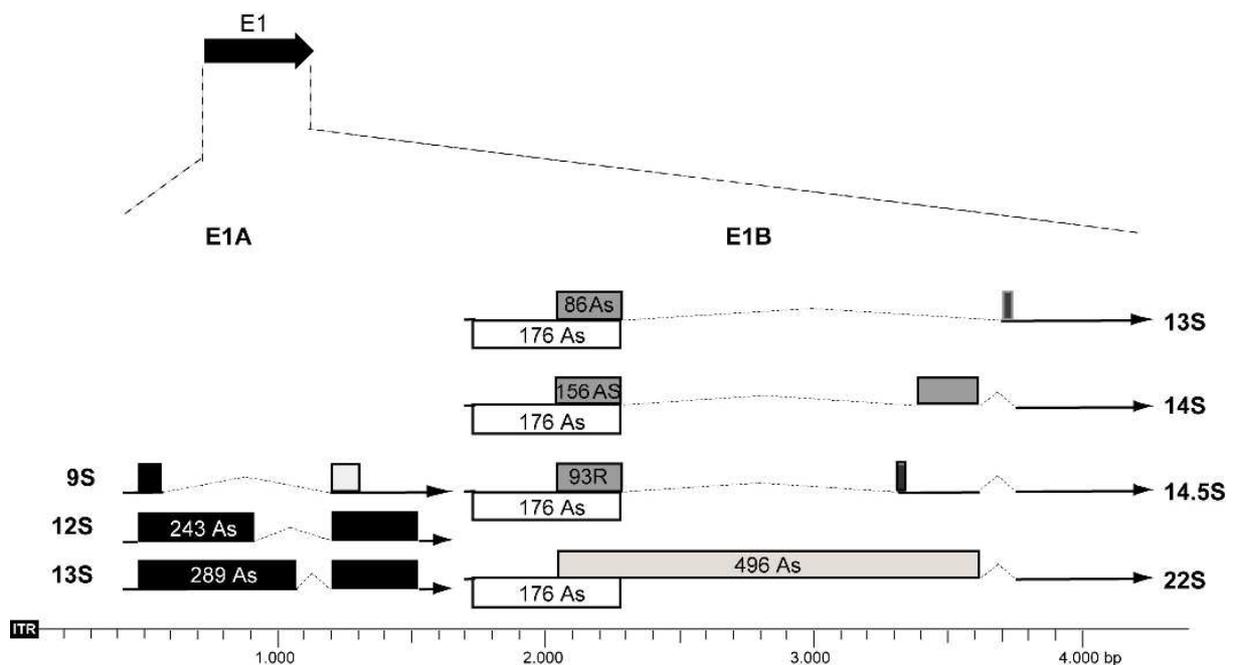


Abb.A.2: Grafische Darstellung der E1-Region von Adenovirus Serotyp 5

Dargestellt ist das linke Ende des adenoviralen Genoms von Serotyp 5. Die Detailansicht zeigt die Lokalisation der E1-Region. Die Vorläufer-Transkripte der E1A- und E1B-Transkriptionseinheit sind als durchgezogene Linien, die entsprechenden Genprodukte als Rechtecke dargestellt. Die Zahlen in den Rechtecken geben die Anzahl der Aminosäuren der jeweiligen E1A- und E1B-Polypeptide an. Das 496 Aminosäuren umfassende Genprodukt der E1-Region wird auch als E1B-55kDa bezeichnet. ITR: *inverted terminal repeat*. (nach Graham, 1984)

Nach einem einfachen Modell induzieren demnach die E1A-Proteine die Immortalisierung primärer Zellen, während die E1B-Genprodukte für das Fortschreiten und die Aufrechterhaltung des vollständig transformierten Phänotyps notwendig sind (zur Übersicht: Williams *et al.*, 1995).

Die beiden nukleären, multifunktionellen Phosphoproteine (E1A 12S und E1A 13S) der E1A-Transkriptionseinheit sind in der Lage, die Zellen durch die Aufhebung der Zellzyklusbarrieren zu immortalisieren (Houweling *et al.*, 1980) und, zusammen mit anderen viralen oder zellulären Onkogenen, Zellen zu transformieren. Diese Funktionen werden durch Interaktionen mit wachstumsinhibitorischen und genregulatorischen Proteinen gewährleistet (zur Übersicht: Russel, 2000). Neben den transformierenden Eigenschaften besitzen die E1A-Genprodukte aber auch die Fähigkeit, Apoptose einzuleiten. Neben p53-abhängigen Apoptosewegen, die durch die Stabilisierung und Aktivierung des zellulären Tumorsuppressors p53 gekennzeichnet sind (White, 1995; Chinnadurai, 1998; White, 1998), ist E1A auch in der Lage, den Zelltod unabhängig von p53 zu einzuleiten (Teodoro *et al.*, 1995; Marcellus *et al.*, 1996). Zur vollständigen Transformation primärer Zellen sind jedoch neben den E1A- auch die E1B-Genprodukte notwendig. Die E1B-Transkriptionseinheit von Ad5 kodiert für zwei Onkoproteine, E1B-55kDa und E1B-19kDa. Beide Proteine transformieren in Kooperation mit E1A primäre Nagerzellen, indem sie zwar unabhängig voneinander, aber additiv wirken (Gallimore *et al.*, 1985; McLorie *et al.*, 1991). Dabei spielt die Funktion beider E1B-Proteine eine Rolle, auf unterschiedlichen Wegen den E1A-induzierten Zelltod zu blockieren (zur Übersicht: Chinnadurai, 1998; White, 1998). Das E1B-19kDa-Protein ist dem zellulären Protoonkogen Bcl-2 funktionell ähnlich und interagiert mit zellulären Apoptoseregulatoren. Obwohl E1B-19kDa nicht an p53 bindet, kann es über einen noch unbekanntem Mechanismus die p53-induzierte Transrepression aufheben, die über den Carboxyterminus des Tumorsuppressorproteins vermittelt wird. Im Gegensatz dazu interagiert E1B-55kDa direkt mit der aminoterminalen Domäne von p53 und inhibiert über seine intrinsische Repressorfunktion die Transaktivierung p53-regulierter Gene (zur Übersicht: White, 1996). Neuesten Untersuchungen zufolge werden diese Vorgänge über die Konjugation von SUMO-1 (*small ubiquitin-like modifier-1*) reguliert (Endter *et al.*, 2001). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass E1B-55kDa auch unabhängig von p53 zur Transformation beitragen kann (Härtl *et al.*, in Vorbereitung).

(Herisse *et al.*, 1981; Freyer *et al.*, 1984; Virtanen *et al.*, 1984). Diese RNA-Prozessierung untersteht einer zeitlich koordinierten Regulation, so dass bestimmte virale Transkripte in der frühen, andere jedoch in der späten Phase der Virusinfektion hergestellt werden (Tigges und Raskas, 1984; Ross und Ziff, 1992; Dix und Leppard, 1993). Die E4-Region kodiert für mindestens sechs verschiedene Genprodukte (Abb.A.2), die entsprechend der Anordnung des jeweiligen offenen Leserahmens (ORF, *open reading frame*) bezeichnet werden und wichtige Funktionen beim lytischen Infektionsverlauf einnehmen (Täuber und Dobner, 2001a).

In den letzten Jahren fanden in Bezug auf Transformation und Onkogenität die beiden frühen E4-Genprodukte E4ORF3 (11 kDa) und E4ORF6 (34 kDa) zunehmende Beachtung. Sie modulieren die Kontrollmechanismen der Wirtszelle im produktiven Infektionszyklus auf allen Ebenen der Genexpression. Dabei zeigen beide Proteine zum Teil redundante, aber auch voneinander unabhängige Funktionen in der viralen DNA-Replikation, der späten viralen Proteinsynthese, dem Abschalten der Wirtszell-Proteinsynthese und der Produktion von Nachkommenviren. Ebenso verhindern sie eine Konkatemerisierung viraler Genome (Halbert *et al.*, 1985; Bridge und Ketner, 1989; Huang und Hearing, 1989; Bridge und Ketner, 1990; Weiden und Ginsberg, 1994). Einige der gemeinsamen Funktionen beruhen auf der Fähigkeit, mit den gleichen viralen und zellulären Faktoren zu interagieren. Sowohl E4ORF3 als auch E4ORF6 binden an E1B-55kDa (Sarnow *et al.*, 1984; Rubenwolf *et al.*, 1997; Leppard und Everett, 1999; Nevels, 1999; Nevels *et al.*, 1999a) und sind in der Lage, Reparaturenzyme von DNA-Doppelstrangbrüchen, wie die DNA-abhängige Proteinkinase (Boyer *et al.*, 1999) und den Mre11/Rad50/NBS1-Komplex (Stracker *et al.*, 2002; Araujo *et al.*, 2005) zu modulieren. Gerade die Wechselwirkung mit verschiedenen zellulären DNA-Reparaturenzymen und deren Inhibition bietet eine mögliche Erklärung für das transformierende Potenzial beider E4-Proteine (Nevels *et al.*, 2001), auf das in den folgenden Kapitel näher eingegangen werden wird.

A.4.3 Die E4-Region und die Hypertransformation

Nachdem man lange Zeit das transformierende Potenzial von Adenoviren einzig auf die E1-Region zurückführte, kann nun auch der E4-Region eine wichtige Funktion im Transformationsprozess zugeordnet werden. Denn 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; Nevels *et*

al., 1997b; 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 (Hypertransformation). 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 korrelieren mit einer dramatischen Reduktion der p53-Mengen (Nevels *et al.*, 1999a). Denn E4ORF6 und E1B-55kDa wirken kooperativ der E1A-induzierten Stabilisierung von p53 entgegen, indem sie p53 verstärkt dem proteasomalen Abbau zuführen (Grand *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997a; Querido *et al.*, 1997a; Roth *et al.*, 1998b; Steegenga *et al.*, 1998; Nevels *et al.*, 1999a; Boyer und Ketner, 2000; Cathomen und Weitzman, 2000; Wienzek *et al.*, 2000). Obwohl p53 sowohl an die amino- als auch carboxyterminale Domäne des E4ORF6-Proteins bindet (Querido *et al.*, 2001b), ist für eine Transformation nur der Carboxyterminus von E4ORF6 notwendig. Diese Effekte sind unabhängig von der p53-Stabilität, umfassen jedoch andere Wechselwirkungen mit dem Tumorsuppressor (Dobner *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997a; Querido *et al.*, 1997a). 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-55kDa-Protein (König *et al.*, 1999; Leppard und Everett, 1999) und weiteren Komponenten der PML NBs (Nevels *et al.*, 1999b). Denn obwohl E4ORF3 PML NBs moduliert, konnte bislang noch keine Interaktion mit PML, dem Hauptbestandteil der PML NBs, nachgewiesen werden (Nevels *et al.*, 1999b).

A.4.4 Die E4-Region und die „hit & run“-Transformation

Im Gegensatz zu E1B, das zusammen mit E1A den klassischen Prinzipien Virus-vermittelter Transformation folgt, verwenden die E4-Genprodukte zusammen mit E1A für die stabile Transformation primärer Zellen einen anderen Mechanismus. Frühere Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe zufolge sind E4ORF3 als auch E4ORF6 in der Lage, die E1B-Funktionen in Bezug auf die Initiation der Transformation in Kooperation mit E1A zu ersetzen (Nevels *et al.*, 2001). Denn während bei der klassischen Transformation, die durch die E1-Region induziert wird, die viralen Gene in den transformierten Zellen persistieren, können bei der so genannten „hit & run“-Transformation in den E1A-E4-transformierten Zelllinien keine E4-

und nur in wenigen Ausnahmefällen *E1A*-spezifische DNA-Fragmente nachgewiesen werden. Trotzdem sind einige dieser Zelllinien dazu imstande, Tumoren in Nacktmäusen zu induzieren (Nevels *et al.*, 2001). Das bedeutet, dass die transiente Expression von *E1A* in Kooperation mit *E4ORF3* oder *E4ORF6* für die onkogene Transformation primärer Zellen ausreichend ist. Dies steht im Einklang mit früheren Studien, wonach die Aufrechterhaltung des onkogenen Phänotyps Adenovirus-transformierter Zellen keineswegs immer die Persistenz viraler DNA-Sequenzen und die permanente Expression dieser Genprodukte erfordert (Paraskeva und Gallimore, 1980; Kuhlmann *et al.*, 1982; Paraskeva *et al.*, 1982; Pfeffer *et al.*, 1999). Vielmehr ist die vorübergehende Expression viraler Onkoproteine und/oder die Integration viraler Gensequenzen ausreichend, um Mutationen zu induzieren („*hit*“), die schließlich zur zellulären Transformation führen. Die Manifestierung des Phänotyps transformierter Zellen ist aufgrund des veränderten Genotyps dann auch trotz des Verlusts viraler DNA-Sequenzen möglich („*run*“). Die molekularen Mechanismen, die der *E1A*- und *E4*-vermittelten „*hit & run*“-Transformation zugrunde liegen, sind jedoch noch unklar. Eine mögliche Erklärung könnten die mutagenen Eigenschaften dieser *E4*-Proteine liefern (Nevels *et al.*, 2001). Zusammen mit *E1A*, das für die unfahrplanmäßige Induktion der zellulären DNA-Synthese verantwortlich ist, führt die Expression von *E4ORF3* und *E4ORF6* durch die Modulation zellulärer Regulatoren der Genexpression, Apoptose und DNA-Reparatur zur Anhäufung von Mutationen. Ein weiterer Aspekt ergibt sich aus der Tatsache, dass alle viralen Proteine, die bislang mit „*hit & run*“-Transformation in Verbindung gebracht wurden (*SV40 TAg*, *HCMV IE1* und *IE2*) mit *PML NBs* assoziiert sind (Carvalho *et al.*, 1995; Ewald *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1997). Da auch *E4ORF3* mit *PML NBs* assoziiert und die Integrität dieser Strukturen moduliert (Carvalho *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996), besteht möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der Umstrukturierung dieser nukleären, multifunktionalen Domänen und der *E4ORF3*-vermittelten Mutagenese und Transformation.

A.5 Zusammensetzung der subnukleären PML NBs

Die Zellkerndomänen PML NBs, die auch als PODs (PML *oncogenic domain*) oder als ND10 (*nuclear domain 10*) bezeichnet werden, befinden sich in den Bereichen zwischen den Chromosomen (Plehn-Dujowich *et al.*, 2000) und konnten in allen bisher untersuchten Säugerzellen detektiert werden (Bouteille *et al.*, 1974; (Ascoli und Maul, 1991; Dyck *et al.*, 1994); Koken *et al.*, 1994; Weis *et al.*, 1994; Hodges *et al.*, 1998). Üblicherweise findet man im Zellkern 10 bis 30 dieser punktförmigen Strukturen, die einen Durchmesser zwischen 250 und 500 nm aufweisen. Ihre Anzahl, Größe und Zusammensetzung hängt jedoch vom Zelltyp, Stadium des Zellzyklus und vom Hormonstatus der Zelle ab (Doucas und Evans, 1996).

Der Hauptbestandteil der NBs, das PML-Protein, enthält am Aminoterminus mehrere wichtige Domänen, die das so genannte RBCC-Motiv (Saurin *et al.*, 1996; Borden *et al.*, 1998a) oder TRIM (*tripartite motif*) (Reymond *et al.*, 2001) bilden. Dies besteht aus drei Cystein-reichen, Zink-bindenden Domänen, dem RING (*really interesting new gene*)-Finger-Motiv, zwei Cystein-/Histidin-reichen B-Boxen (B1 und B2) sowie einer putativen α -helikale *coiled-coil*-Domäne mit der Kernimportsequenz NLS (*nuclear localisation sequence*) (Saitoh *et al.*, 1997; Borden *et al.*, 1998a).

Dieses RBCC-Motiv vermittelt Protein-Protein-Wechselwirkungen und ist für die Multimerisierung von PML sowie für die Lokalisation in PML NBs verantwortlich, besitzt jedoch keine DNA-Bindungsaktivität (Zhong *et al.*, 2000; Jensen *et al.*, 2001). Es sind verschiedene PML-Isoformen bekannt, die durch alternatives Spleißen entstehen. Während die meisten Isoformen mit den PML NBs oder der nukleären Matrix assoziieren, befindet sich lediglich ein geringer Anteil im Zytoplasma (Daniel *et al.*, 1993; Dyck *et al.*, 1994; Koken *et al.*, 1994; Weis *et al.*, 1994; Jensen *et al.*, 2001).

Bis heute wurden neben PML und Sp100 (Borden, 2002) bereits mehr als 60 weitere Proteine gefunden, die in den PML NBs transient oder auch konstitutiv vorliegen (Tab.A.2). Jedoch ist nur eine geringe Zahl derer in der Lage, direkt mit PML zu interagieren, wie z.B. die Tumorsuppressoren p53 und Rb (Retinoblastom), der Transkriptionskoaktivator CBP, der Transkriptionsrepressor Daxx, das Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc9 und der Translationsinitiationsfaktor eIF4E (zur Übersicht: Maul *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 2001; Dellaire und Bazett-Jones, 2004).

Interaktion mit PML	PML-assoziierte Proteine	Mögliche Funktionen der PML NBs	Referenz
Direkt (Überprüfung mit gereinigten Komponenten)	Ubc9/SUMO-1	SUMO-1-Modifizierung von PML durch Ubc9 ist wichtig für Rekrutierung von PML-assoziierten Proteinen	(Duprez <i>et al.</i> , 1999) (Ishov <i>et al.</i> , 1999)
	eIF4E	Negative Regulation der eIF4E-Funktionen (Nukleozytoplasmatischer Export von Wachstumsstimulierenden mRNAs und Proteinsynthese)	(Cohen <i>et al.</i> , 2001) (Lai und Borden, 2000) (Kentsis <i>et al.</i> , 2001)
	PRH	Rolle in der Differenzierung des Knochenmarks	(Topcu <i>et al.</i> , 1999)
	Z (LCMV)	Z relokalisiert PML ins Zytoplasma, mögliche Rolle bei Proteinsynthese und Apoptose	(Borden <i>et al.</i> , 1998b) (Campbell Dwyer <i>et al.</i> , 2000)
Indirekt (Kokolisierung, Koimmunpräzipitation)	Ribosomales P-Protein, eIF3/Int-6, L7a, EF1	Proteinsynthese (zytoplasmatische und nukleäre Translation)	(Borden <i>et al.</i> , 1998a) (Desbois <i>et al.</i> , 1996b) (Morris-Desbois <i>et al.</i> , 1999)
	GAPDH (RNA-abhängige PML-Interaktion)	Regulation neuartiger GAPDH-Funktionen (tRNA-Pendelaktivität, Bindung an AU-reiche RNA)	(Carlile <i>et al.</i> , 1998)
	BLM (Zellzyklus-abhängige PML NB-Assoziation)	DNA-Reparatur	(Wang <i>et al.</i> , 2001) (Yankiwski <i>et al.</i> , 2000)
	NCoR	Vermittelt transkriptionelle Repression	(Khan <i>et al.</i> , 2001)
	p53, Rb, CBP (Ras-induzierte PML NB-Assoziation)	Regulation der Transkription, DNA-Reparaturantwort, Apoptose	(LaMorte <i>et al.</i> , 1998) (Alcalay <i>et al.</i> , 1998) (Ferbeyre <i>et al.</i> , 2000) (Boisvert <i>et al.</i> , 2001) (Doucas <i>et al.</i> , 1999). (Pearson <i>et al.</i> , 2000)
	ISG20 (IFN-induzierte PML NB-Assoziation)	Mögliche Beteiligung an antiviraler Abwehr, IFN-induzierte RNase	(Gongora <i>et al.</i> , 1997)

Tab.A.2: Tabellarischer Überblick über die Interaktion und Assoziation verschiedener Proteine mit PML bzw. PML NBs (nach:Strudwick und Borden, 2002)

Darüber hinaus findet man innerhalb dieser Strukturen auch das Ubiquitin-ähnliche Protein SUMO-1 (*small ubiquitin-like modifier-1*) (Boddy *et al.*, 1996), das kovalent an PML bindet

(Sternsdorf *et al.*, 1997; Kamitani *et al.*, 1998b; Muller *et al.*, 1998). Die Modifizierung von PML erfolgt dabei an drei verschiedenen Lysinresten: an Position 65 innerhalb des RING-Finger-Motivs, an Position 160 im B-Box-Motiv und an Position 490 innerhalb der NLS (Kamitani *et al.*, 1998a).

Die Modifizierung von Proteinen mittels SUMO-1 scheint entweder spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen zu regulieren, die subzelluläre Verteilung der Proteine innerhalb spezifischer Zellkompartimente zu steuern, oder deren Ubiquitin-abhängigen Abbau entgegen zu wirken (Matunis *et al.*, 1996; Saitoh *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 1998; Desterro *et al.*, 1999; Everett, 1999).

Die Integrität der PML NBs hängt stark von dem PML-Protein ab, da PML NBs in PML-defizienten Mausfibroblasten nicht nachgewiesen werden können. Die übrigen PML NB-Komponenten weisen darüber hinaus eine veränderte Verteilung auf und liegen stattdessen sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma in Form von unzähligen winzigen, punktförmigen Strukturen vor (Ishov *et al.*, 1999). Die Überexpression von Wildtyp-PML in diesen Zellen ermöglicht dagegen die richtige Zusammenlagerung der PML NB. PML, das nicht mehr durch SUMO-1 modifiziert werden kann, ist dazu jedoch nicht in der Lage (Zhong *et al.*, 2000). Die SUMO-1-Modifizierung scheint daher für die Lokalisation von PML in den NBs und die Aufrechterhaltung der NB-Struktur von entscheidender Bedeutung zu sein (Kamitani *et al.*, 1998a; Muller *et al.*, 1998; Ishov *et al.*, 1999; Melchior, 2000).

Aber auch in humanen Zellen spielt PML eine wichtige Rolle für die strukturelle Integrität von PML NBs. So findet man in APL (akute promyelozytische Leukämie)-Zellen, in denen PML als Fusionsprotein PML-RAR (*retinoic acid receptor*) α infolge einer Chromosomentranslokation t(15;17) vorliegt, keine intakten PML NBs (de The *et al.*, 1991; Goddard *et al.*, 1991; Kakizuka *et al.*, 1991; Kastner *et al.*, 1992). Die Expression des Fusionsproteins PML-RAR α in APL-Zellen ist ausreichend für die Transformation und die Entwicklung von Leukämien (Altabef *et al.*, 1996; Brown, 1997; Grisolan *et al.*, 1997). Die Ursache hierfür ist die Zerstörung der strukturellen Integrität der PML NBs (zur Übersicht: Doucas und Evans, 1996).

Die Behandlung von APL mit Retinsäure führt dagegen zur Wiederherstellung der NB-Struktur und zum Tumorrückgang (Melnick und Licht, 1999; Zhu *et al.*, 2001). Diese Tatsache unterstreicht die Bedeutung der Integrität von PML NBs für die Regulation zellulärer Prozesse. PML NBs stellen daher aktive Zentren für die Regulation der Transkription und für posttranslationale Modifizierungen (SUMOylierung, Ubiquitylierung, Azetylierung) dar und/oder dienen als Depots und Abbaustätten für überschüssige bzw. falsch gefaltete Proteine

(Ruggero *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2000; Negorev und Maul, 2001; Borden, 2002; Eskiw und Bazett-Jones, 2002). Zahlreiche Studien zeigen zudem, dass PML wichtige Funktionen in der Regulation der Seneszenz, der Apoptose, der Zellproliferation und Transformation besitzt. Darüber hinaus gibt es vermehrt Hinweise, dass PML im Falle einer Virusinfektion wichtige Aufgaben bei der angeborenen Immunantwort der Wirtszelle übernimmt (Ruggero *et al.*, 2000; Negorev und Maul, 2001; Eskiw und Bazett-Jones, 2002).

A.6 Virus-induzierte Modifizierung der PML NBs

Die Beteiligung von PML an der angeborenen Immunität gründet sich auf mehrere Beobachtungen und wird zumindest teilweise über die Interferon (IFN)-Antwort vermittelt. So konnten Chang und seine Kollegen zum einen zeigen, dass PML die Antigen-Präsentation von MHC (*major histocompatibility complex*)-Klasse I-Moleküle erhöht (Chang *et al.*, 2002). Ein möglicher Einfluss des PML-Proteins auf die Regulation der Expression der MHC-Klasse I-Moleküle konnte jedoch nicht beobachtet werden (Bruno *et al.*, 2003). Zum anderen beeinflusst IFN die Expression einiger PML NB-assoziierte Proteine, wie beispielsweise PML und Sp100 (Sternsdorf *et al.*, 1997). Außerdem enthält die Promotorsequenz von PML verschiedene funktionale, durch INF induzierte Aktivierungsregionen (Stadler *et al.*, 1995). Darüber hinaus ist IFN an verschiedenen antiviralen Mechanismen beteiligt (Regad und Chelbi-Alix, 2001). Schließlich führt IFN zu einer signifikanten Zunahme der PML NBs hinsichtlich ihrer Anzahl und Größe (Barber, 2001; Regad und Chelbi-Alix, 2001).

PML NBs sind darüber hinaus häufig das Ziel unterschiedlichster regulatorischer Proteine von RNA- und DNA-Viren (Tab.A.3). Dazu zählen Adenoviren, Herpesviren, Hepatitisviren, Papillomaviren sowie das humane Immundefizienzvirus Typ-1 (HIV-1) und das humane T-Zell-Leukämievirus Typ-1 (HTLV-1) (Desbois *et al.*, 1996a; Doucas und Evans, 1996; Day *et al.*, 1998; Doucas und Evans, 1999). Grundsätzlich verfolgen Viren dabei verschiedene Strategien, die Funktionen der PML NBs für eigene Zwecke zu nutzen.

Zum einen erlaubt die Integration viraler Genome in unmittelbarer Nähe dieser subzellulären Kompartimente eine verbesserte Virusreplikation. So befinden sich sowohl die Virusgenome des humanen Herpes Simplex Virus Typ1 (HSV-1) als auch dessen Transkriptionsregulator ICP4 während der Virusvermehrung in direkter Nachbarschaft zu den PML NBs (Everett *et al.*, 2003).

Zum anderen führt die Assoziation viraler Proteine mit den PML NBs zu deren Zerstörung und/oder zu einer veränderten Lokalisation einiger NB-Komponenten. Dies ermöglicht einerseits die Erhöhung der viralen Genexpression und blockiert aber andererseits die Immunabwehr des Wirtes. So löst HSV-1 bereits 2 h nach Infektion die PML NB-Strukturen vollkommen auf. Genetische Analysen zeigen, dass für diesen Effekt das virale Genprodukt ICP0 verantwortlich zeichnet (Maul und Everett, 1994; Everett *et al.*, 1998). Die Zerstörung dieser NBs erfolgt aufgrund des proteasomalen Abbaus von Sp100, der von ICP0 induziert wird (Chelbi-Alix und de The, 1999). Eine ähnliche Aktivität wurde auch dem frühen Protein IE1 des humanen Zytomegalievirus (hCMV) zugeschrieben (Ahn und Hayward, 1997; Ahn *et al.*, 1998; Wilkinson *et al.*, 1998). Bei der lytischen Vermehrung des Epstein-Barr Virus (EBV) kann man hingegen eine stufenweise Freisetzung verschiedener PML NB-Komponenten beobachten. Dabei werden Sp100 und Daxx vor und PML nach Beendigung der Virusreplikation aus den PML NBs entfernt (Bell *et al.*, 2000).

Virus	Zielprotein	Mechanismus	Referenz
Adenovirus	PML	E4ORF3 induziert die Umstrukturierung der PML NBs	(Carvalho <i>et al.</i> , 1995) (Puvion-Dutilleul <i>et al.</i> , 1995)
HSV-1	PML Sp100	ICP0 induziert die Relokalisation und die Degradierung beider Proteine	(Everett <i>et al.</i> , 1998) (Everett <i>et al.</i> , 1999) (Chelbi-Alix und de The, 1999)
HCMV	PML	IE1 zerstört PML NBs und verursacht verringerte SUMO-1-Modifikation von PML	(Ahn <i>et al.</i> , 1998) (Muller und Dejean, 1999)
EBV	PML	EBNA5 kolokalisiert mit PML NBs; BZLF1 zerstört PML NBs	(Szekely <i>et al.</i> , 1996) (Bell <i>et al.</i> , 2000)
Papillomavirus	PML	L2 kolokalisiert mit PML NBs und rekrutiert L1 und E2	(Day <i>et al.</i> , 1998)
HDV	PML	L-HDAg verändert PML NBs	(Bell <i>et al.</i> , 2000)
HFV	PML	Tas kolokalisiert mit PML NBs	(Regad <i>et al.</i> , 2001)
HTLV-1	Int-6	Tax relokalisiert PML NB-assoziiertes Int-6-Protein ins Zytoplasma	(Desbois <i>et al.</i> , 1996a)
LCMV	PML	Z-Protein relokalisiert PML ins Zytoplasma	(Borden <i>et al.</i> , 1998a)

Tab.A.3: Virus-induzierte Modulation von PML NBs (nach Regad und Chelbi-Alix, 2001)

Infektionen mit Adenovirus Typ 5 führen ebenfalls in der frühen Phase der Replikation zu einer Modulation der PML NBs (Carvalho *et al.*, 1995; Puvion-Dutilleul *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996). Auch wenn zwei frühe Proteine E1A und E4ORF3 mit den PML NBs assoziieren, scheint E4ORF3 allein für diese Reorganisation ausreichend zu sein (Carvalho *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996; Ishov und Maul, 1996). Der Einfluss von E4ORF3 auf die PML NB lässt sich jedoch nicht mit einer veränderten SUMOylierung von exogenem PML erklären, wie Experimente in kotransfizierten Zellen zeigen (Muller und Dejean, 1999). Nach der E4ORF3-induzierten Umstrukturierung bilden die PML NB-Komponenten schließlich elongierte, fadenartige Strukturen aus, mit denen dann ein weiteres frühes Protein, E1B-55kDa, assoziieren kann (Carvalho *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996).

Die Tatsache, dass viele virale Replikationszentren in nächster Nähe der PML NBs zu finden sind, deutet darauf hin, dass PML NBs ein wichtiges Reservoir unterschiedlicher zellulärer Faktoren bilden, die für die Virusvermehrung von großem Nutzen sind. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass PML und insbesondere PML NBs an der Abwehr von Virusinfektionen beteiligt sind. Dies könnte eine Ursache dafür sein, dass diese subzellulären Strukturen häufig Ziele von viralen Proteinen sind und durch diese moduliert und/oder inaktiviert werden.

Da in den PML NB eine Vielzahl verschiedener zellulärer Tumorsuppressorproteine sowie viraler Onkoproteine vorliegen und die Zerstörung dieser Strukturen ursächlich an der malignen Erkrankung APL beteiligt ist, scheint es sich hierbei um mögliche Zielstrukturen von (Virus-induzierten) Transformationsvorgängen zu handeln.

A.7 Funktionen und Struktur von p300/CBP

Die Beteiligung von E1A an Adenovirus-vermittelten Transformationsprozessen konnte bereits Ende der 80er Jahre des vorherigen Jahrhunderts u.a auf die Interaktion mit p300 zurückgeführt werden (Whyte *et al.*, 1989). Denn wie nachfolgende Untersuchungen belegten, spielt der Tumorsuppressor p300 eine wichtige Rolle bei E1A-induzierten Vorgängen. Dazu gehören die Modulation der Expression zellulärer Proteine, die Inhibierung der Differenzierung, das Vorantreiben des Zellzyklus sowie die Transformation (zur Übersicht: Moran, 1993; Eckner *et al.*, 1994).

P300 zeigt auf Ebene der Aminosäuresequenz eine große Homologie im Vergleich zu dem CREB (*cyclic AMP response element*)-bindenden Protein CBP. Beide Proteine haben mehrere

funktionelle Domänen gemeinsam (Arany *et al.*, 1994). Dazu zählen die Bromodomäne, drei Cystein-Histidin(CH)-reiche Domänen (CH1, CH2 und CH3), eine KIX-Domäne sowie die ADA2-Region, die eine große Ähnlichkeit mit einem transkriptionellen Koaktivator aus der Hefe aufweist. Die CH1-, CH3- und auch die KIX-Region scheinen eine wichtige Rolle bei Protein-Protein-Wechselwirkungen zu spielen, denn sie stellen Bindestellen für eine Reihe unterschiedlicher Faktoren dar (Abb.C.11). Kristallografische Untersuchungen der Bromodomäne einer weiteren Histonazetyltransferase (HAT) P/CAF (*p300/CBP associated factor*) (Dhalluin *et al.*, 1999a) legen zudem die Vermutung nahe, dass diese Domänen spezifisch azetylierte Lysinreste erkennen und binden. Während der Amino- und der Carboxyterminus für die Aktivierung der Transkription verantwortlich ist, ist im zentralen Abschnitt von p300/CBP eine intrinsische HAT-Aktivität zu finden. Diese Region ist für sich genommen ausreichend für die N^ε-Lysin-Azyetylierung bestimmter Zielproteine.

Sowohl p300 als auch CBP fungieren in der Hauptsache als Transkriptionskoaktivatoren für eine Vielzahl von Sequenz-spezifischen, DNA-bindenden Faktoren, wie beispielsweise Steroid-Hormonrezeptoren (Kamei *et al.*, 1996) 6), c-Jun (Bannister *et al.*, 1995), Fos (Bannister und Kouzarides, 1995), p53 (Avantaggiati *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 1997; Lill *et al.*, 1997) und NFκB (Merika *et al.*, 1998). Darüber hinaus sind beide Proteine in der Lage, mit allgemeinen Transkriptionsfaktoren zu interagieren (Kee *et al.*, 1996; Imhof *et al.*, 1997; Nakajima *et al.*, 1997).

P300 und CBP dienen daher als wichtiges Bindeglied verschiedener DNA-bindender Transkriptionsaktivatoren und Komponenten des basalen Transkriptionsapparats. Zudem bilden beide Koaktivatoren Plattformen für Transkriptionsfaktoren und ermöglichen dadurch eine spezifische transkriptionelle Aktivierung bestimmter Gene als Antwort auf Umwelteinflüsse. Dies bestätigen Untersuchungen an Virus-induzierbaren Promotoren, wonach p300/CBP nach Virusinfektion die Bindung verschiedener Faktoren an spezifische DNA-Erkennungsmotive (*enhancer*) des IFN-Promotors vermittelt und auf diese Weise die Expression von IFN reguliert (Merika *et al.*, 1998; Munshi *et al.*, 1998).

Die Fähigkeit von p300/CBP, die Transkriptionsrate spezifisch zu erhöhen, wird aber auch auf andere Art und Weise erreicht. So konnten im Jahr 1996 zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander zeigen, dass sowohl CBP als auch p300 eine HAT-Aktivität besitzen (Bannister und Kouzarides, 1996; Ogryzko *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu anderen HAT-Enzymen sind p300/CBP in der Lage, alle vier Histone *in vitro* und wahrscheinlich auch *in vivo* zu modifizieren (Tab.A.4) (Schiltz *et al.*, 1999). Die Einführung von Azetyl-Gruppen auf den flexiblen Armen von Histonen bewirkt eine Auflockerung des Chromatins im Bereich des

Promotors und Transkriptionsstarts. Die Azetylierung spezifischer Lysinreste führt scheinbar zur Neutralisierung positiver Ladungen und schwächt dadurch die starke Wechselwirkung zwischen Histonen und DNA-Molekülen (zur Übersicht: Brownell und Allis, 1996; Wolffe und Pruss, 1996). Azetylierung von Histonen wird daher schon lange Zeit mit aktiver Transkription in Verbindung gebracht (Allfrey *et al.*, 1964), ist jedoch nur eine von weiteren möglichen Histon-Modifizierungsarten, wie Phosphorylierung, Methylierung und Ubiquitinylierung.

Neben Histonen können p300/CBP auch eine große Anzahl von Nicht-Histon-Proteinen azetylieren (Tab.A.4). Dazu gehören beispielsweise p53, p73, Rb und E2F (Gu und Roeder, 1997; Sakaguchi *et al.*, 1998; Martinez-Balbas *et al.*, 2000; Marzio *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2001; Costanzo *et al.*, 2002). Dies führte zu der Annahme, dass Azetylierung eine wichtige posttranslationale Modifikation darstellt (Kouzarides, 2000) wie die Phosphorylierung beeinflusst die Azetylierung von Proteinen eine Vielzahl verschiedener Prozesse. Die Azetylierung durch p300/CBP beispielsweise bewirkt, dass p53 *in vitro* mit höherer Affinität an DNA bindet (Sakaguchi *et al.*, 1998), p53 stabilisiert (Ito *et al.*, 2001) und seine Transkriptionsrate *in vivo* gesteigert wird (Avantaggiati *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 1997; Lill *et al.*, 1997; Barlev *et al.*, 2001; Espinosa und Emerson, 2001). Eine verstärkte Azetylierung von p53 stellt einen Mechanismus für die Reparatur von DNA-Schäden dar, denn diese konnte insbesondere nach Behandlung der Zellen mit UV-Licht beobachtet werden (Liu *et al.*, 1999). Abgesehen von der Aktivierung der p53-vermittelten Transkription spielt p300 auch eine entscheidende Rolle bei der negativen Regulation von p53. So konnten Livingston und Kollegen zeigen, dass der tertiäre Komplex bestehend aus der E3-Ubiquitin-Ligase MDM2, p300 und p53 von großer Bedeutung für den MDM2-abhängigen Abbau von p53 ist.

Substrat	Funktion <i>in vivo</i>	HAT	Effekt der Azetylierung
Histone			
H2A/ H2B	Nukleosom-Komponente	p300/CBP	Chromatin-Auflockerung, Genaktivierung
H3	Nukleosom-Komponente	p300/CBP P/CAF SRC-1 ACTR	Chromatin-Auflockerung, Genaktivierung
H4	Nukleosom-Komponente	p300/CBP P/CAF SRC-1 ACTR	Chromatin-Auflockerung, Genaktivierung, Histon <i>deposition</i> , Zusammenbau des Nukleosoms

Substrat	Funktion <i>in vivo</i>	HAT	Effekt der Azetylierung
Chromosomale Nicht-Histon-Proteine			
HMG1	Chromatin-Komponente	p300/CBP	ND
HMG2	Chromatin-Komponente	ND	ND
HMG14	Nukleosom-Bindung	p300/CBP	abgeschwächte Nukleosom-Bindung
HMG17	Nukleosom-Bindung	P/CAF	abgeschwächte Nukleosom-Bindung
HMG1(Y)	<i>Enhanceosome</i> -Komponente	P/CAF p300/CBP	Zusammenbau des <i>Enhanceosomes</i> Zerstörung des <i>Enhanceosomes</i>
Transkriptionsaktivatoren			
p53	Tumorsuppressor	P/CAF, p300/CBP	Erhöhte DNA-Bindungsaffinität
c-Myb	Zellproliferation, Differenzierung	p300/CBP, GCN5	Erhöhte DNA-Bindungsaffinität
MyoD	Muskeldifferenzierung	P/CAF	Erhöhte DNA-Bindungsaffinität
E2F	Zellzykluskontrolle	P/CAF	Erhöhte DNA-Bindungsaffinität
Koaktivatoren nukleärer Rezeptoren			
ACTR	Transkriptionelle Antwort auf Hormonsignale	P300/CBP	Störung der Rezeptor-Interaktion
SRC-1		P300/CBP	ND
Generelle Transkriptionsfaktoren			
TFIIE	Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie	P/CAF P300/CBP	ND
TFIIF		P/CAF P300/CBP	ND
Virale Proteine			
HIV-1 Tat	HIV-1 Transaktivierung	P/CAF P300/CBP	Erhöhte CDK9-Bindung Freisetzung der TAR RNA
Ad E1A	Transaktivator, Transrepressor	P/CAF P300/CBP	Inhibierung der CtBP-Assoziation, Stimulierung der Akkumulation im Zellkern
SV40 TAg	Regulator der Transkription	P300/CBP	Stimulierung der Virusreplikation

Tab.A.4: Übersicht über Histone und Nicht-Histon-Proteine und deren Histonazetyltransferasen
(nach Sterner und Berger, 2000; Hasan und Hottiger, 2002; Yang, 2004). ND: nicht untersucht.

Während MDM2 *in vitro* lediglich Ubiquitin-Monomere an p53 anfügt, vermittelt neuesten Erkenntnissen zufolge die E4-Ligase-Aktivität von p300 die Anheftung von Ubiquitinketten an das Mono-ubiquitin von p53. Auf diese Weise scheinen beide Ligase-Aktivitäten für die Generierung von Polyubiquitin-modifizierten p53 und der damit verbundenen proteasomalen Degradierung von p53 notwendig zu sein (Grossman *et al.*, 1998; Rodriguez *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2001; Grossman *et al.*, 2003). Darüber hinaus blockiert der Komplex aus p300 und MDM2 die Azetylierung von p53 (Kobet *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001). Die Inhibierung der p300 HAT-Aktivität begünstigt deshalb die MDM2-vermittelte Ubiquitylierung, die an denselben Lysinresten in der carboxyterminalen Region von p53 erfolgt wie die Azetylierung (Gu und Roeder, 1997; Sakaguchi *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 2000).

Zusammengefasst ergeben sich mehrere Möglichkeiten, wie p300 und CBP zur Aktivierung der Transkription beitragen können. Erstens durch die Azetylierung von Histonen, die zu einer Auflockerung der Chromatinstruktur führt. Zweitens, durch ihre Funktion als Koaktivatoren, die eine Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren und den Komponenten des Transkriptionsapparates ermöglicht. Drittens, durch die Azetylierung von allgemeinen und Sequenz-spezifischen, DNA-bindenden Faktoren, die DNA-Protein- und Protein-Protein-Wechselwirkung fördert und/oder stabilisiert. Obwohl es sich bei p300/CBP um funktionelle Homologe handelt, die viele gemeinsame Funktionen haben, gibt es vermehrt Hinweise darauf, dass sie an der Regulation unterschiedlicher Gene beteiligt sind (Kawasaki *et al.*, 1998).

A.8 Regulation von p300/CBP durch virale Onkoproteine

Die zentrale Stellung von p300/CBP in der Steuerung des Zellzyklus wird vor allem durch die Tatsache illustriert, dass beide Proteine nicht nur tumorsupprimierende Eigenschaften aufweisen (Petrij *et al.*, 1995; Borrow *et al.*, 1996; Muraoka *et al.*, 1996), sondern auch prominente Ziele von viralen Proteinen darstellen. Diese Onkoproteine, zu denen unter anderem HIV Tat, das SV40 große T-Antigen (TAg) sowie Ad E1A zählen (Kiernan *et al.*, 1999; Ott *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2002), modulieren die Funktionen von p300/CBP und nutzen diese für eigene Zwecke (Tab.A.4).

So steuert die zeitlich regulierte Azetylierung des Transkriptionsaktivators Tat durch verschiedene HAT-Enzyme den genauen Ablauf der Transkription. Tat bindet an die *cis*-aktive, konservierte RNA-Sekundärstruktur TAR (*Tat-associated region*) von HIV-1 Transkripten.

Die Interaktion von Tat mit p300/CBP und dem Transkriptions-Elongationsfaktor CyclinT1/CDK9 ermöglicht die Einleitung der Transkription (Benkirane *et al.*, 1998; Hottiger und Nabel, 1998; Marzio *et al.*, 1998). Erst die Azetylierung von Tat durch p300 am Lysin⁵⁰ innerhalb des RNA-Bindemotivs führt jedoch zur Transaktivierung und Elongation der Transkription (Kiernan *et al.*, 1999; Ott *et al.*, 1999; Dormeyer *et al.*, 2003). Diese Modifizierung bewirkt die Auflösung des Tat/TAR/Cyclin T1-Komplexes und die Bildung eines Tat/P/CAF-Komplexes, der mit RNA-Polymerase II interagieren kann (Dorr *et al.*, 2002; Mujtaba *et al.*, 2002). Die Azetylierung des Lysins²⁸ wiederum erfolgt dagegen durch P/CAF und erhöht die Bindungsaffinität von Tat an CyclinT1/CDK9 (Kiernan *et al.*, 1999; Deng *et al.*, 2000). Aufgrund des hohen Tat-Überschusses im Vergleich zur TAT-RNA, stellt die Modifizierung durch HATs eine Möglichkeit dar, die Bindung und Dissoziation von limitierten HIV-1 Tat an TAR genau zu regulieren.

Die Interaktion von Ad E1A und p300/CBP dient hingegen der Modulation des Zellzyklus. Seit der Entdeckung von p300 als ein E1A-assoziiertes Protein (Whyte *et al.*, 1989), sind in der Zwischenzeit weitere Transkriptionskoaktivatoren mit intrinsischer HAT-Aktivität (P/CAF, p300/CBP) bekannt geworden, die an E1A binden (Eckner *et al.*, 1994; Arany *et al.*, 1995; Lundblad *et al.*, 1995; Reid *et al.*, 1998; Lang und Hearing, 2003). Die Interaktion von E1A, SV40 TAg sowie P/CAF mit p300/CBP erfolgt hierbei über dessen CH3-Domäne (Yang *et al.*, 1996; Puri *et al.*, 1997; Shuen *et al.*, 2003). Nakatani und Kollegen konnten zudem zeigen, dass E1A oder SV40 TAg die Komplexbildung von p300 und P/CAF bzw. CBP und P/CAF blockiert. Überexpression von E1A induziert den Eintritt in die S-Phase, während hohe Mengen an P/CAF folglich eine Arretierung in der G₁-Phase bewirken (Yang *et al.*, 1996). Die Beobachtung, dass E1A eine Interaktion zwischen P/CAF und p300/CBP verhindert, unterstreicht die Bedeutung des P/CAF/p300/CBP-Komplexes bei der Blockierung der Zellzyklusprogression. Die Kontrolle des Zellzyklus erfolgt scheinbar durch die Modulierung von Genen, deren Produkte, wie z.B. p21/WAF, den Übergang von der G₁- zur S-Phase beeinflussen (Lill *et al.*, 1997; Scolnick *et al.*, 1997; Somasundaram und El-Deiry, 1997). Der Einfluss von E1A auf Funktionen von p300/CBP ist nicht nur auf eine bloße physikalische Interaktion zurückzuführen. E1A ist nämlich in der Lage, die HAT-Aktivität von p300 gezielt zu blockieren, indem es zwar die Azetylierung von Histonen und von p53 verhindert, aber selbst noch azetyliert wird (Chakravarti *et al.*, 1999; Hamamori *et al.*, 1999). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass E1A durch die Bindung an p300 eine Stabilisierung und Repression der Transaktivierung von p53 induziert (Chiou und White, 1997; Thomas und White, 1998). Im Gegensatz zu p300 wird die HAT-Aktivität von CBP

durch E1A stimuliert (Ait-Si-Ali *et al.*, 1998). Diese Beobachtung macht deutlich, dass es einen entscheidenden Unterschied und eine hohe Spezifität bei der E1A-vermittelten Regulation von p300- und CBP-Funktionen gibt. Zusammenfassend verhindert E1A einerseits Azetylierungs-abhängige Aufgaben von p300/CBP, die an der Wachstumskontrolle beteiligt sind, indem es beispielsweise den Tumorsuppressor p53 moduliert. Andererseits fördert E1A all diejenigen p300/CBP-Aktivitäten, welche eine Überwindung der Zellzyklusbarrieren ermöglichen.

A.9 Regulation der p53-Funktionen durch adenovirale Onkoproteine

Gerade wegen seiner wichtigen Funktion als Tumorsuppressor ist das p53-Protein bereits seit mehr als zehn Jahren Gegenstand intensiver Forschungen (Vogelstein *et al.*, 2000). Denn etwa die Hälfte aller humanen Tumoren ist auf Mutationen innerhalb der *p53*-Gensequenz zurückzuführen. Bei Tumoren jedoch, in denen Wildtyp-p53 vorliegt, wird vermutet, dass die Defekte durch die fehlende Induktion des Tumorsuppressors selbst oder durch fehlerhafte, p53-induzierte Nachfolgeprozesse hervorgerufen werden. Die Regulation von p53 untersteht einer strengen Kontrolle und erfolgt mit Hilfe verschiedener Strategien, wie p53-Stabilität und p53-Lokalisation. Daneben kann durch posttranslationale Modifikationen die Sequenz-spezifische Bindung von p53 an spezifische Promoterregionen und damit die Transkription bestimmter Gene reguliert werden. Als Reaktion auf unterschiedliche Stresssignale (DNA-Schädigungen, Onkogene) wird eine Steigerung der p53-abhängigen Transkriptionsaktivierung durch Phosphorylierung, SUMOylierung und Azetylierung am Carboxyterminus von p53 erzielt (Gu und Roeder, 1997; Gostissa *et al.*, 1999; Meek, 1999; Rodriguez *et al.*, 1999). In Folge der p300/CBP-vermittelten Azetylierung beispielsweise kann man eine höhere DNA-Affinität *in vitro* (Sakaguchi *et al.*, 1998), eine Stabilisierung (Ito *et al.*, 2001) und eine gesteigerte Transkriptionsaktivierung von p53 *in vivo* beobachten (Avantaggiati *et al.*, 1997; Gu und Roeder, 1997; Lill *et al.*, 1997; Barlev *et al.*, 2001; Espinosa und Emerson, 2001). P53 ist dadurch in Lage, verschiedene zellulärer Gene, wie *p21*, *cyclin G*, *mdm2* und *bax1* zu aktivieren. Die Produkte dieser Gene spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse wie den Zellzyklus, DNA-Replikation und Apoptose (Gottlieb und Oren, 1996; Ko und Prives, 1996; Levine, 1997).

Viren haben vielfältige Mechanismen entwickelt, um die Zellzyklus-Kontrolle des p53-Proteins zu inaktivieren und so optimale Bedingungen für die eigene Vermehrung zu schaffen. Demnach binden das SV40 TAg und das X-Protein des Hepatitis-B-Virus an p53 und verhindern die Ausbildung der funktionell aktiven p53-Tetramere. Bei den Papillomaviren hingegen führen die E6-Proteine nach Komplexbildung mit p53 den Tumorsuppressor dem Ubiquitin-abhängigen Abbau zu (Murakami, 2001; Wsierska-Gadek und Horky, 2003; Barbanti-Brodano *et al.*, 2004).

Aber auch einige frühe adenovirale Proteine können die Aktivität von p53 modulieren und dadurch seine wichtigen Funktionen stören. Als erstes adenovirales Protein, das p53 inhibieren kann, wurde E1B-55kDa identifiziert (Sarnow *et al.*, 1982b; Yew und Berk, 1992). Yew und Kollegen konnten zeigen, dass E1B-55kDa durch Bindung an p53 dessen Transaktivierung blockiert, obwohl der Tumorsuppressor noch an seine Konsensussequenzen innerhalb der Promotorregion bindet (Yew *et al.*, 1994). Neben E1B-55kDa kann ein weiteres adenovirales Protein unabhängig von dem E1B-Protein an p53 binden (Sarnow *et al.*, 1982b; Dobner *et al.*, 1996). Dobner und Kollegen konnten zeigen, dass E4ORF6 die Aktivität von p53 blockieren kann, indem es direkt mit dem Carboxyterminus von p53 interagiert und damit die Bindung von TAF32 an die Aktivierungsdomäne von p53 verhindert (Dobner *et al.*, 1996). Zusammen mit E4ORF6 reguliert E1B-55kDa die Genexpression auf posttranslationaler Ebene, indem es dadurch den proteasomalen Abbau von p53 beschleunigt (Querido *et al.*, 1997a; Roth *et al.*, 1998a; Steegenga *et al.*, 1998; Querido *et al.*, 2001a). Erst vor kurzem wurde der E1B-55kDa/E4ORF6-Komplex als Untereinheit eines SCF-ähnlichen Komplexes (Skp1, Cdc53/Cullin, F-Box-Rezeptor) identifiziert, dessen Funktion die Ubiquitylierung von Proteinen ist (Querido *et al.*, 2001b; Harada *et al.*, 2002). In der Zwischenzeit ist bekannt, dass der E1B-55kDa/ E4ORF6-Komplex die proteasomale Degradation von p53 über einen Ubiquitin-abhängigen Mechanismus steuert. Weiterhin unklar ist jedoch, ob der p53-Abbau innerhalb des Zellkern und/oder im Zytoplasma stattfindet (Harada *et al.*, 2002; Blanchette *et al.*, 2004).

Fehlt hingegen das E4ORF6-Protein, wie im Falle von Ad E1-transformierten Zellen, kann man eine Stabilisierung von p53 sowohl durch E1B (van den Heuvel *et al.*, 1993) als auch E1A (Lowe und Ruley, 1993) beobachten. Die Stabilisierung von p53 durch E1A ist in erster Linie auf eine verlängerte Halbwertszeit von p53 zurückzuführen (Braithwaite *et al.*, 1990; Lowe und Ruley, 1993; Querido *et al.*, 1997b). Bisher wurden drei verschiedene Mechanismen beschrieben, die zur Stabilisierung von p53 durch das frühe E1A-Protein beitragen. Zum ersten ist die E1A-vermittelte Stabilisierung von p53 auf die Inhibierung von p300/CBP

zurückzuführen, das im Komplex mit Mdm2 die Polyubiquitinylierung und dadurch die Degradierung von p53 bewirkt (Grossman *et al.*, 1998; Rodriguez *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2001; Grossman *et al.*, 2003). Zum zweiten könnte der Tumorsuppressor Rb eine wichtige Rolle bei der Regulation der p53-Stabilität in humanen Zellen spielen (Querido *et al.*, 1997b). Die Inaktivierung des Rb-Proteins durch E1A resultiert in einer Akkumulation von p14^{ARF}, das p53 stabilisiert und aktiviert (de Stanchina *et al.*, 1998; Samuelson *et al.*, 2005). Schließlich kann die Stabilisierung von p53 durch die spezifische Interaktion von E1A mit dem 26S-Proteasom herbeigeführt werden (Grand *et al.*, 1999; Turnell *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2004). Interessanterweise sind Ad E1A-Virusmutanten, die nicht über die Fähigkeit verfügen, mit der 26S Untereinheit zu interagieren, nicht in der Lage, p53 zu stabilisieren. Die E1A-induzierte Stabilisierung und dadurch bedingte Akkumulation des Tumorsuppressorproteins führt schließlich zu einer Verlangsamung der zellulären, aber auch der viralen Replikationsvorgänge bis hin zur Induktion des programmierten Zelltodes (Debbas und White, 1993; Querido *et al.*, 1997b). Aus diesem Grund haben Adenoviren verschiedene Mechanismen entwickelt, die der Stabilisierung von p53 und den daraus resultierenden Konsequenzen entgegenwirken. Analog zu E1B-55kDa hat auch das E1A-Protein Einfluss auf die p53-abhängige Transaktivierung. Denn durch die Interaktion mit p300/CBP kann E1A den durch DNA-Schäden induzierten und p53-vermittelten Zellzyklusarrest aufheben (Somasundaram und El-Deiry, 1997). Die wichtigsten Aufgaben bei der negativen Regulation der p53-Funktionen (Repression und proteasomaler Abbau) werden aber vor allen Dingen den beiden Proteinen E1B-55-kDa und E4ORF6 zugeschrieben. Für das E4ORF3-Protein dagegen werden keine solchen Funktionen beschrieben, obwohl es ähnlich wie E4ORF6 in transformierten Rattenzellen, mutagene Eigenschaften besitzt und in der Lage ist, einige der E1B-Funktion zu ersetzen. Interessanterweise jedoch sind die nukleären Zielstrukturen von E4ORF3 – PML NBs – für die transkriptionelle Aktivierung des p53-Proteins verantwortlich. Denn in den PML NBs befinden sich als Reaktion auf verschiedene Stresssignale neben PML auch p53 und p300/CBP, welche die Azetylierung von p53 am Carboxyterminus vermitteln (Ferbeyre *et al.*, 2000; Fogal *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2000; Pearson *et al.*, 2000).

A.10 Zielsetzung und Aufgabenstellung dieser Arbeit

Die Entwicklung onkolytischer Adenovirus-Vektoren gilt als viel versprechender Ansatz für die Behandlung von Tumoren. Der bekannteste Vertreter dieser Vektoren ist ONYX-015, der einen Defekt in der E1B-Region aufweist. Aufgrund genetischer Veränderungen in der E1-Transkriptionseinheit ist ONYX-015 scheinbar in der Lage, selektiv in bestimmten Tumorzelltypen zu replizieren. Da die molekularen Mechanismen für die spezifische Virusvermehrung noch weitestgehend unklar sind, sollten – gerade auch aus Gründen der Sicherheit – alle Genprodukte dieser Vektoren einer gründlichen Analyse unterzogen werden. Denn neben den Proteinen der E1-Region können auch zwei Genprodukten der E4-Region – E4ORF3 und E4ORF6 – transformierende Eigenschaften zugeschrieben werden. Erstrebenswertes Ziel für den Einsatz in der Tumorthherapie ist daher die Entwicklung von sicheren onkolytischen Vektoren, die gezielt und effizient Tumorzellen zerstören können, ohne dabei selbst Transformation und maligne Veränderungen zu induzieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das E4ORF3-Protein, da es zwar mutagene Eigenschaften aufweist, aber für eine effiziente Replikation von E1B-Virusmutanten unerlässlich ist, weiteren Analysen unterzogen werden. Ein wesentliches Ziel war deshalb die Identifizierung von Bereichen, die für das transformierende Potenzial bzw. für die lytische Virusvermehrung wichtig sind. Dazu sollten zunächst durch umfangreiche Mutationsanalysen potenzielle Modifizierungsstellen und putative Proteinmotive innerhalb von E4ORF3 identifiziert werden, um weitere Aufschlüsse über mögliche Funktionen des E4ORF3-Proteins zu erhalten. Dabei sollte auch der Frage nachgegangen werden, welche Bereiche innerhalb von E4ORF3 für die Reorganisation subnukleärer PML NB-Strukturen relevant sind. Weiterhin sollten durch In-vivo-Bindungsstudien zelluläre Interaktionspartner identifiziert werden, welche die PML NB-Assoziation des E4ORF3-Proteins vermitteln. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte durch funktionelle Studien, Transformations- und Mutageneseversuche geklärt werden, welche Bereiche von E4ORF3 für dessen transformierendes Potenzial notwendig sind. Schließlich sollten mit Hilfe eines in unserer Arbeitsgruppe neu entwickelten Klonierungssystems verschiedene E4ORF3-Virusmutanten hergestellt werden, um zu überprüfen, ob die für die Virusreplikation wichtigen Funktionen mit denen identisch sind, die für die Transformation von primären Zellen verantwortlich sind.

B Material und Methoden

B.1 Bakterienstämme und Nährmedien

B.1.1 Bakterienstämme

Die Klonierung rekombinanter DNA-Plasmide wurden mit den *Escherichia coli* (*E. coli*) K12-Bakterienstämmen DH5 α (Hanahan, 1983) und GM 2136 durchgeführt. Bei der *Quick-Change*TM *Site-Directed Mutagenesis* kamen XL1-*blue* (STRATAGENE, Amsterdam, Niederlande) und GM 2136 zum Einsatz. Zur Klonierung mutierter Adenovirus-Genome wurde der Stamm XL2-*blue* verwendet (STRATAGENE, Amsterdam, Niederlande). Die entsprechenden Bakterienstämme sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Stamm	Beschreibung
GM 2136:	F- <i>dam-13::Tn9</i> , <i>dcm-6</i> , <i>hsdR2</i> , <i>leuB6</i> , <i>his-4</i> , <i>thi-1</i> , <i>ara-14</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>rpsL</i> 136, <i>tonA31</i> , <i>tsc-78</i> , <i>supE44</i> , <i>mcrA-</i> , <i>mcrB-</i> (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Göttingen)
DH5α:	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> (Hanahan, 1983)
XL1-<i>blue</i>:	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , [F' <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q Z.M15, Tn10 (Tet ^r)] (Bullock, 1987)
XL2-<i>blue</i>:	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , [F' <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q Z.M15, Tn10 (Tet ^r), Amy, Cam ^r] (Bullock, 1987; Greener und Jerpseth, 1993)

GM 2136 zeichnet sich durch das Fehlen der DNA-Methyltransferasen Dam und Dcm aus. Die Methylierung des Adenins in der Sequenz 5'-CATC-3' bzw. des internen Cytosins in der Sequenz 5'-CCAGG-3' verhindert die endonukleolytische Spaltung von Nukleinsäuren durch bestimmte Restriktionsendonukleasen.

Der *E. coli*-Stamm DH5 α weist eine Deletion im 5'-Bereich des chromosomalen *lacZ*-Gens auf. Durch Komplementation mit dem pUC-kodierten *lacZ*- α -Peptid erhält die verkürzte β -

Galaktosidase ihre Aktivität zurück. Dies ermöglicht die Selektion von Transformanten und positiven Rekombinanten mit Hilfe der Blau-Weiß-Selektion.

Die beiden hoch kompetenten *E. coli*-Stämme *XL1-blue* und *XL2-blue* (STRATAGENE, Amsterdam, Niederlande) erlauben ebenfalls die Blau-Weiß-Selektion. Darüber hinaus ermöglichen beide Stämme aufgrund verschiedener Antibiotikaresistenzen auf dem F'-Episom die Selektion mit unterschiedlichen Antibiotika.

B.1.2 Nährmedien

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte sowohl in Flüssig- als auch auf Plattenkulturen in sterilem Luria Bertani (LB)-Medium [90 mM NaCl, 1% Bacto-Trypton (DIFCO, Hamburg), 0,5% Hefeextrakt (DIFCO, Hamburg), pH 7,3]. Der Zusatz von Ampizillin (Amp) in einer Endkonzentration von 100 µg/mL Medium (LB_{Amp}-Medium) ermöglichte die negative Selektion der transformierten Bakterien.

B.2 Expressionsvektoren

pcDNA3.1(+)-Expressionsvektor: Der Polylinker des vom pUC19 abgeleiteten eukaryontischen Expressionsvektors pcDNA3.1(+) (5.446 Bp) der Firma INVITROGEN, Leek wird von dem Promotor T7 und Sp6 flankiert. Die Transkription integrierter Gensequenzen erfolgt unter Kontrolle des hCMV (humanen Cytomegalovirus)-*immediate-early* Promotors. Die Transkripte werden mit Hilfe des vektoreigenen Polyadenylierungssignals BGHPolyA (*bovine growth hormone polyA*) polyadenyliert. Innerhalb des Polylinkers befindet sich zudem ATG als Translationsstartpunkt, so dass Gensequenzen integriert werden können, die selbst kein Startcodon besitzen. Der Vektor enthält zusätzlich Resistenzgene: Ampizillin für die Selektion in prokaryontischen sowie Neomycin für die Selektion in transfizierten, eukaryontischen Zellen.

B.3 Allgemeine und standardisierte DNA-Klonierungstechniken

B.3.1 Enzymatische Spaltung von Nukleinsäuren mit Restriktionsenzymen

Zur Charakterisierung der aus *E.coli* isolierten Plasmid-DNA sowie für präparative Zwecke wird die DNA mit Restriktionsendonukleasen enzymatisch geschnitten. Eine Einheit [U] bezeichnet dabei die Enzymaktivität, die benötigt wird, um 1 µg λ-DNA in 1 h bei geeigneter Temperatur und optimalen Puffer- bzw. pH-Bedingungen vollständig zu spalten.

Zur Charakterisierung gereinigter Plasmid-DNA wurde 1 µg DNA mit 10 U Restriktionsendonuklease (BOEHRINGER, Mannheim; NEW ENGLAND BIOLABS, Schwalbach/Taunus) und 1/10 Volumen Restriktionspuffer in einem 20 µL Ansatz gespalten. Für präparative Zwecke wurde in einem Standardansatz 5 µg Plasmid-DNA mit je 50 U Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 50 µL ebenfalls mit 1/10 Volumen Restriktionspuffer für mindestens 2 h inkubiert.

Klonierungsschritte, welche eine Spaltung an nicht-methylierten Schnittstellen erforderten, wurden mit aus dem *E. coli*-Stamm GM2136 präparierten Plasmiden durchgeführt.

B.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung linearisierter DNA-Fragmente (0,1 kBp bis 10 kBp) hinsichtlich ihres Molekulargewichts erfolgt bei konstanter Stromstärke und Spannung (50 V bis 150 V). Je nach errechneter Größe der DNA-Fragmente wurde zwischen 0,8% und 2,0% Agarose (*Seakem LE agarose*, FMC BIOPRODUCTS, Rockland, USA) in TAE-Puffer [40 mM Tris/HCl pH 8,0, 20 mM NaOAc, 2 mM EDTA] unter Aufkochen gelöst und mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 50 ng/ml versetzt. Die DNA-Fragmente wurden mit 1/10 Volumen DNA-Auftragspuffer [0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol, 50% (v/v) Glycerin, 2% (v/v) in 50 x TAE] versetzt und zur Abschätzung der Fragmentgröße zusammen mit dem entsprechenden Molekulargewichtsmarker (100 Bp und 1 kBp-Leiter; GIBCO LIFE TECHNOLOGIES, Karlsruhe) aufgetragen. Die Detektion der DNA erfolgte mit Hilfe eines UV-Durchlichtschirms (BACHHOFER LABORATORIUMSGERÄTE, Reutlingen) bei einer Wellenlänge von 312 nm, dem Absorptionsmaximum des DNA-interkallierenden Ethidiumbromids.

B.3.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die mittels Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente wurden für die anschließende Ligation aus dem Agarosegel geschnitten. Für die weitere Extraktion von DNA-Molekülen mit einer Größe von 200 Bp bis 10 kBp eignete sich die *QIAquick Gel Extraction*-Methode (QIAGEN, Düren), bei der die DNA selektiv unter Hochsalzbedingungen an die Silikat-Säulenmatrix gebunden und anschließend bei Niedrigsalzbedingungen mit 10 mM Tris/HCl pH 8,5 nach Angaben des Herstellers von der Säulenmatrix eluiert wurde.

B.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die aus dem Agarosegel extrahierten DNA-Fragmente wurden in den molaren Verhältnissen Vektor:Insert von 1:3 bis 1:10 für die Ligation eingesetzt. Der Standardligationsansatz von 20 μ L enthielt neben 10 ng bis 50 ng Vektor-DNA, 20 U T4-DNA-Ligase (NEW ENGLAND BIOLABS, Schwalbach/Taunus), 1 x T4-Ligase-Puffer [20 mM Tris/HCl pH 7,6, 5 mM Dithiothreitol (DTT), 5 μ g/ml BSA (*bovine serum albumine*), 0,1 mM ATP], sowie unterschiedliche Konzentrationen an Fremdgen-DNA. Die Reaktion erfolgte 15 min bei Raumtemperatur (RT) und anschließend über Nacht (ÜN) bei 13°C im Wasserbad und konnte anschließend direkt zur Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen (B.3.5.1) eingesetzt werden.

Für die Transformation mittels Elektroporation (B.3.5.2) musste zur Entfernung der darin enthaltenen Salze die DNA im Ligationsansatz zunächst gefällt werden. Hierzu wurde die Plasmid-DNA unter Zugabe von je 5 μ L Lachssperma-DNA (Träger-DNA), 1/10 Volumen 3 M NaOAc und 0,7 Volumen Isopropanol für 20 min bei RT und 21.000 x g gefällt. Nach einem Waschschrift mit 75%igem Ethanol wurde die DNA getrocknet und in H₂O_{bid.} aufgenommen.

B.3.5 Transformation von *E. coli*

B.3.5.1 Rubidiumchlorid-Methode

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien nach der Rubidiumchlorid-Methode wurden 200 mL SOC/SOB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) in einem Verhältnis von 1:100 mit einer ÜN-Bakterienkultur angeimpft. Nach Erreichen einer optischen Dichte (OD) von 0,3 bis 0,5 wurden die Bakterien bei 4°C und 3.000 x g sedimentiert, in 100 mL Lösung A [10 mM MOPS (3-N-Morpholinopropansulfonsäure) pH 5,8, 0,3 M KAc, 10 mM RbCl, 15% Glycerin] resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Nach

anschließender Resuspension mit 50 mL Puffer B [10 mM MOPS pH 6,5, 10 mM RbCl, 50 mM CaCl₂ x 2 H₂O, 15% Glycerin] wurde die resultierende Bakteriensuspension aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Die kompetenten *E. coli*-Zellen werden auf Eis aufgetaut und mit ca. 50 ng bis 1 µg Plasmid-DNA versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis, in der die DNA an die Zellen adsorbiert, werden die Proben für 45 s auf 42°C (Hitzeschock) erwärmt und anschließend 15 min auf Eis gestellt. Der Reaktionsansatz wird dann nach Zugabe von nicht-selektivem LB-Medium so lange schüttelnd inkubiert, bis die Antibiotikaresistenz des transformierenden Plasmids exprimiert wird. Um Einzelkolonien zu erhalten, wird die Bakteriensuspension auf geeignete Selektionsplatten ausgestrichen und ÜN bei 37°C im Brutschrank angezogen.

B.3.5.2 Elektroporation

Die Gewinnung elektrokompenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach Sharma und Schimke (Sharma und Schimke, 1996). Hierzu wurde YENB-Medium [0,75% (w/v) *bacto yeast extract*, 0,8% (w/v) *bacto nutrient broth*] mit 1/100 Volumen ÜN-Bakterienkultur angeimpft. Nach dem Erreichen einer OD_{600nm} von 0,5 bis 0,9 wurden die Bakterien bei 4°C und 3.000 x g zentrifugiert. Das erhaltene Bakteriensediment wurde daraufhin zweimal mit je 100 mL eiskaltem H₂O_{bid}, ein weiteres Mal mit 20 mL 10%-igem Glycerin gewaschen und schließlich in 3 mL 10%-igem Glycerin resuspendiert und aliquotiert. Nach dem Einfrieren der Bakterien in flüssigen Stickstoff erfolgte deren Lagerung bei -80°C.

Die elektrokompenten *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 50 ng bis 1 µg salzfreier Plasmid-DNA versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (BIORAD, München) mit einem Elektrodenabstand von 1 mm überführt. Die Elektroporation erfolgte mit Hilfe eines *Gene Pulser*-Gerätes (BIORAD, München) nach Angaben des Herstellers bei einer Spannung von 1,25 kV, einer Kapazität von 25 µF sowie einem Parallelwiderstand von 200 Ω. Nach dem elektrischen Impuls wurden die transformierten Bakterien zur Regeneration in LB₀-Medium aufgenommen und bei 37°C geschüttelt. Schließlich wurde die Bakteriensuspension auf LB-Nährböden mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und wiederum bei 37°C inkubiert.

B.3.6 Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Charakterisierung hergestellter Subklone erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA nach dem Protokoll der alkalischen Schnelllyse ("Minipräp", Birnboim und Doly, 1979). Größere Mengen an Plasmid-DNA für Subklonierungen sowie Transfektionen eukaryontischer Zellen wurden dagegen über *Qiagen*-Säulen (Anionenaustauscher-Chromatographie) nach Angaben des Herstellers (QIAGEN, Düren) gereinigt. Je nach gewünschter Ausbeute wurden Midi- oder Maxi-Säulen verwendet.

Konzentration und Reinheit isolierter Plasmid-DNA wurden mit Hilfe eines Zweistrahl-Spektrophotometers (VARIAN GMBH, Darmstadt) in einem UV-Absorptionsspektrum zwischen 230 und 300 nm ermittelt. Aus dem Wert der OD bei einer Wellenlänge von 258 nm (OD_{258}) konnte die Konzentration doppelsträngiger DNA (dsDNA) nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz berechnet werden ($1 OD_{258} = 47,5 \mu\text{g dsDNA/mL}$).

B.4 PCR (*polymerase chain reaction*)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur überexponentiellen Vervielfältigung (Amplifizierung) definierter Nukleotidsequenzen *in vitro* (Saiki *et al.*, 1988). Die Durchführung erfolgte in einem programmierbaren PERKIN ELMER GeneAmp™ 9600-Thermocycler. Zur Vermeidung von Sequenz-unspezifischer Amplifizierung wurde im *hot start* PCR-Verfahren die Ziel-DNA mit den Oligonukleotiden und den Nukleotiden (dNTPs) erst kurz vor Beginn der Reaktion bei einer Temperatur zwischen 70 und 80°C mit der Polymerase und dem Reaktionspuffer vereinigt.

B.4.1 Standard-PCR

Die Taq[®]-Polymerase (NEW ENGLAND BIOLABS, Schwalbach/Taunus), isoliert aus dem thermophilen Eubakterium *Thermus aquaticus*, ist eine hitzestabile, hochprozessive DNA-abhängige DNA-Polymerase (1 kB/min) ohne Exonuklease-Aktivität.

Dieses Protokoll fand Verwendung bei der Isolierung und Gewinnung von DNA-Sequenzen aus Plasmiden und bei der Charakterisierung positiver Transformanten (*PCR-Screening*).

In einer Standard-PCR wurden 50 bis 100 ng Plasmid-DNA in einem 100 μL Ansatz [2,5 U Taq[®]-Polymerase, 0,25 mM dNTP-Mix, 5 pmol 3'-Oligonukleotid, 5 pmol 5'-Oligo-

nukleotid, 1 x Reaktionspuffer (10 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, pH 8,3, 2 mM MgCl₂)] unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

Schritt	Funktion	Temperatur	Dauer
1	Initiation	95°C	3 min
3-Stufen-PCR: 30 Zyklen			
2	Denaturierung	95°C	1 min
	Annealing	55 bis 65°C	1 min
	Elongation	72°C	1 min/kB
3	Endelongation	72°C	10 min
4		4°C	∞

Alle PCR-Produkte wurden vor ihrer Weiterverwendung mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* (QIAGEN, Düren) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

B.4.2 Zielgerichtete In-vitro-Mutagenese mittels PCR

Diese Methode eignet sich zum Einfügen oder Entfernen von Punktmutationen in definierte Bereiche dsPlasmid-DNA. Mit Hilfe zweier komplementärer, 30 Bp bis 45 Bp langen Oligonukleotide mit GC-reichen Enden, die in ihrer Sequenz den gewünschten Austausch enthalten, wird in einer PCR-Reaktion *dam*-methylierte Plasmid-DNA als Matrize verwendet und durch die Pfu-DNA-Polymerase (3'-5' Exonuklease-Aktivität) amplifiziert. Die Entfernung der methylierten Ausgangs-DNA wird durch die Zugabe von 10 U des Restriktionsenzym *DpnI* gewährleistet. *DpnI* erkennt spezifisch die Sequenz 5'-G^{m6}ATC-3' und spaltet sie endonukleolytisch. Die mutierte, zirkuläre, nicht-methylierte und noch unligierte dsDNA wird nach der Transformation von *E. coli* XL1-*blue* oder GM 2136 durch die bakterielle DNA-Ligase kovalent geschlossen.

Die genaue Sequenz und Bezeichnung der für die In-vitro-Mutagenese benötigten Oligonukleotide sind in der nachstehenden Tabelle aufgeführt:

Nr.	Bezeichnung	Sequenz
#455	E4ORF3 K8R	5'-Oligonukleotid für In-vitro-Mutagenese der E4ORF3 Wt-kodierenden Region aus dem Plasmid pcDNA HA E4ORF3 Wt bzw. pE4-Wt 5'-CTTGAGGCTGAGGGTGGAGGGCGCTCTG-3'
#456	E4ORF3 K8R	3'-Oligonukleotid für In-vitro-Mutagenese der E4ORF3 Wt-kodierenden Region aus dem Plasmid pcDNA HA E4ORF3 Wt bzw. pE4-Wt 3'-CAGAGCGCCCTCCACCCTCAGCCTCAAG-5'
#1140	E4ORF3 L13A	5'-Oligonukleotid für In-vitro-Mutagenese der E4ORF3 Wt-kodierenden Region aus dem Plasmid pcDNA HA E4ORF3 Wt bzw. pE4-Wt 5'-GAAGGTGGAGGGCGCTGCGGAGCAGATTTTAC-3'

Nr.	Bezeichnung	Sequenz
#1141	E4ORF3 L13A	3'-Oligonukleotid für In-vitro-Mutagenese der E4ORF3 Wt-kodierenden Region aus dem Plasmid pcDNA HA E4ORF3 Wt bzw. pE4-Wt 3'-GTAAAAATCTGCTCCGAGCGCCCTCCACCTTC-5'
#1107	E4ORF3 NES	5'-Oligonukleotid für In-vitro-Mutagenese der E4ORF3 Wt-kodierenden Region aus dem Plasmid pcDNA HA E4ORF3 Wt bzw. pE4-Wt 5'-CTGGAGCAGGCTTTTACAGCCGCCGGAGCCAATGCTCGGGATTTG-3'
#1108	E4ORF3 NES	3'-Oligonukleotid für In-vitro-Mutagenese der E4ORF3 Wt-kodierenden Region aus dem Plasmid pcDNA HA E4ORF3 Wt bzw. pE4-Wt 3'-CAAATCCCAGCATTTGGCTCCGGCGGTGTAAAAGCCTGCTCCAG-5'
#414	E4ORF3 Y40A	5'-Oligonukleotid für In-vitro-Mutagenese der E4ORF3 Wt-kodierenden Region aus dem Plasmid pcDNA HA E4ORF3 Wt bzw. pE4-Wt 5'-GCGAGATGAGAATGCTTTGGGCATGGTTG-3'
#415	E4ORF3 Y40A	3'-Oligonukleotid für In-vitro-Mutagenese der E4ORF3 Wt-kodierenden Region aus dem Plasmid pcDNA HA E4ORF3 Wt bzw. pE4-Wt 3'-CAACCATGCCCAAAGCATTCTCATCTCGC-5'
#707	E4ORF3 EE52/53A	5'-Oligonukleotid für In-vitro-Mutagenese der E4ORF3 Wt-kodierenden Region aus dem Plasmid pcDNA HA E4ORF3 Wt bzw. pE4-Wt 5'-GCTGGAATGTTTATAGCCGCCATTCACCCTGAAGGG-3'
#708	E4ORF3 EE52/53A	3'-Oligonukleotid für In-vitro-Mutagenese der E4ORF3 Wt-kodierenden Region aus dem Plasmid pcDNA HA E4ORF3 Wt bzw. pE4-Wt 3'-CCCTTCAGGGTGAATGGCGGCTATAAACATTCCAGC-5'
#1092	E4ORF3 N82A	5'-Oligonukleotid für In-vitro-Mutagenese der E4ORF3 Wt-kodierenden Region aus dem Plasmid pcDNA HA E4ORF3 Wt bzw. pE4-Wt 5'-GTGCAACATCTTACAGCTGCCATTATCTGTTC-3'
#1093	E4ORF3 N82A	3'-Oligonukleotid für In-vitro-Mutagenese der E4ORF3 Wt-kodierenden Region aus dem Plasmid pcDNA HA E4ORF3 Wt bzw. pE4-Wt 3'-GAACAGATAATGGCAGCTGTAAGATGTTGCAC-5'
#447	E4ORF3 GG97/98AA	5'-Oligonukleotid für In-vitro-Mutagenese der E4ORF3 Wt-kodierenden Region aus dem Plasmid pcDNA HA E4ORF3 Wt bzw. pE4-Wt 5'-GACCACGCCACCGCAGCAGAGCGCGTTCAC-5'
#448	E4ORF3 GG97/98AA	3'-Oligonukleotid für In-vitro-Mutagenese der E4ORF3 Wt-kodierenden Region aus dem Plasmid pcDNA HA E4ORF3 Wt bzw. pE4-Wt 3'-GAGAACGCGCTCTGCTGCGGTGGCGTGGTC-5'
#963	E4ORF3 GG/Stopp	5'-Oligonukleotid für In-vitro-Mutagenese der E4ORF3 Wt-kodierenden Region aus dem Plasmid pcDNA HA E4ORF3 Wt bzw. pE4-Wt 5'-GCCACCGGAGGGTAGCGGTTCACTTAATAG-3'
#964	E4ORF3 GG/Stopp	3'-Oligonukleotid für In-vitro-Mutagenese der E4ORF3 Wt-kodierenden Region aus dem Plasmid pcDNA HA E4ORF3 Wt bzw. pE4-Wt 3'-CTATTAAGTGAACGCGCTACCCTCCGGTGGC-5'
#416	E4ORF3 L103A	5'-Oligonukleotid für In-vitro-Mutagenese der E4ORF3 Wt-kodierenden Region aus dem Plasmid pcDNA HA E4ORF3 Wt bzw. pE4-Wt 5'-GGAGCGGTTTACGCAATAGATCTTC-3'
#417	E4ORF3 L103A	3'-Oligonukleotid für In-vitro-Mutagenese der E4ORF3 Wt-kodierenden Region aus dem Plasmid pcDNA HA E4ORF3 Wt bzw. pE4-Wt 3'-GAAGATCTATTGCGTGAACGCGCTCC-5'
#1153	E4ORF3 L106	5'-Oligonukleotid für In-vitro-Mutagenese der E4ORF3 Wt-kodierenden Region aus dem Plasmid pcDNA HA E4ORF3 Wt bzw. pE4-Wt 5'-GCGTTCCT TAATAGATGCTCATTTTGAGGTTTTGG-3'
#1154	E4ORF3 L106	3'-Oligonukleotid für In-vitro-Mutagenese der E4ORF3 Wt-kodierenden Region aus dem Plasmid pcDNA HA E4ORF3 Wt bzw. pE4-Wt 3'-CCAAAACCTCAAATGAGCATCTATTAAGTGAACGC-5'
#1097	E4ORF3 L111A	5'-Oligonukleotid für In-vitro-Mutagenese der E4ORF3 Wt-kodierenden Region aus dem Plasmid pcDNA HA E4ORF3 Wt bzw. pE4-Wt 5'-CTTCATTTGAGGTTGCGGATAATCTTTTGG
#1098	E4ORF3 L111A	3'-Oligonukleotid für In-vitro-Mutagenese der E4ORF3 Wt-kodierenden Region aus dem Plasmid pcDNA HA E4ORF3 Wt bzw. pE4-Wt 3'-CCAAAAGATTATCCGCAACCTCAAATGAAG-5'
#1151	E4ORF3 L115A	5'-Oligonukleotid für In-vitro-Mutagenese der E4ORF3 Wt-kodierenden Region aus dem Plasmid pcDNA HA E4ORF3 Wt 5'-GAGGTTTTGGATAATCTTGCGGAATAAAAAAAAAAAAAACATGG-3'
#1152	E4ORF3 L115A	3'-Oligonukleotid für In-vitro-Mutagenese der E4ORF3 Wt-kodierenden Region aus dem Plasmid pcDNA HA E4ORF3 Wt 3'-CCATGTTTTTTTTTTTATTCGCAAGATTATCCAAAACCTC-5'

Laut Herstellerangaben wird die PCR-vermittelte, ortsgerichtete Mutagenese ausgehend von 25 bis 50 ng Ziel-DNA in einem 50 µL Ansatz [2,5 U Pfu-DNA-Polymerase, 0,25 mM dNTP-Mix, 125 ng *sense*-Oligonukleotid, 125 ng *antisense*-Oligonukleotid, 1 x *Reaction buffer*] unter den angegebenen Standard-Bedingungen durchgeführt.

Schritt	Funktion	Temperatur	Dauer
1	Initiation	94°C	3 min
3-Stufen-PCR: 16 Zyklen			
2	Denaturierung	94°C	1 min
	Annealing	55°C	45 s
	Elongation	68°C	2 min/kB
3	Endelongation	68°C	10 min
4		4°C	∞

B.5 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma METABION, Martinsried bezogen und sind je nach Verwendungszweck unter B.4.2 bzw. B.6 aufgeführt. Die Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese und die Sequenzieroligonukleotide waren entsalzt.

B.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzanalyse der jeweiligen DNA erfolgte durch automatisierte, nicht-radioaktive Fluoreszenzsequenzierung, die auf der Basis der Didesoxynukleotid-vermittelten Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) beruht.

Bei der Sequenzierung von Plasmid-DNA wurden 300 ng DNA und 6 pmol des entsprechenden Oligonukleotids, bei der Sequenzierung von adenoviraler Bacmid-DNA und Ad5-DNA wurden hingegen 1 µg DNA und 25 pmol Oligonukleotid nach Angaben des Herstellers mit der jeweiligen Menge an Reaktionsgemisch (*Prism Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit*, APPLIED BIOSYSTEMS, Weiterstadt) versetzt.

Im Anschluss daran wurde eine Amplifikation mit 60 Zyklen (15 s bei 96°C, 15 s bei 55°C und 4 min. bei 60°C) durchgeführt. Die Reaktionsprodukte wurden nach den Anweisungen des Herstellers gereinigt und in einem 7%-igen denaturierenden Polyacrylamid-Sequenziergel aufgetrennt.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm SeqEd™, Version 1.0.3 (APPLIED BIOSYSTEMS, Weiterstadt). Die DNA-Sequenzierungen dieser Arbeit wurden von Holger Melzl am Institut und von GENEART (Regensburg) durchgeführt.

Nr.	Bezeichnung	Sequenz
#635	T7	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung der pcDNA3-Expressionskonstrukte 5'-GAATTGTAATACGACTCACTATAG-3'
#636	Sp6	3'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung der pcDNA3-Expressionskonstrukte 3'-GATTAGGTGACACTATAGAATAC-5'
#764	pH5pg4100 32.443 nt	3'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (32.443 nt) 3'-GCGAGTCACACACGGGAGG-5'
#765	pH5pg4100 32.918 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (32.918 nt) 5'-CTTGGCGATGGAGCGCAGG-3'
#767	pH5pg4100 31.282 nt	3'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (31.282 nt) 5'-CCAGCTGCTGAGCCACAGG-3'
#792	pH5pg4100 6.320 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (6.320 nt) 5'-CTTGGCGATGGAGCGCAGG-3'
#793	pH5pg4100 6.889 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (6.889 nt) 5'-GGGACCGAGGTGCTACG-3'
#794	pH5pg4100 7.400 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (7.400 nt) 5'-CCAGAGCAAAAAGTCCGTGC-3'
#795	pH5pg4100 8.004 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (8.004 nt) 5'-GGTGGCAGGATGCGAGCC-3'
#796	pH5pg4100 8.598 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (8.598 nt) 5'-GGGGTGTCTTGGATGATGC-3'
#797	pH5pg4100 9.202 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (9.202 nt) 5'-CATAACCCAGCGTCGCAACG-3'
#798	pH5pg4100 9.756 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (9.756 nt) 5'-GTCACAGTCGCAAGGTAGG-3'
#799	pH5pg4100 10.347 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (10.347 nt) 5'-GTCGTTGCAAGTCCGCACC-3'
#800	pH5pg4100 10.912 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (10.912 nt) 5'-GCTCGCTCCCTGTAGCCG-3'
#801	pH5pg4100 11.452 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (11.452 nt) 5'-CATGGCCTGAATCGCGAGC-3'
#802	pH5pg4100 12.044 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (12.044 nt) 5'-CGAGCGCATCCACAAGGC-3'
#803	pH5pg4100 12.630 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (12.630 nt) 5'-CTGGTCTACGACGCGCTGC-3'
#804	pH5pg4100 13.164 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (13.164 nt) 5'-GGACGAGCATACTTCCAGG-3'
#805	pH5pg4100 13.738 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (13.738 nt) 5'-CAGATGCTAGTAGCCATTCC-3'
#806	pH5pg4100 14.301 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (14.301 nt) 5'-CCCGCCGTTTGTGCCTCC-3'
#807	pH5pg4100 14.681 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (14.681 nt) 5'-GAGTGGGTGGAGTTCACGC-3'
#808	pH5pg4100 15.214 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (15.214 nt) 5'-CGACACCTTGCCACACGG-3'
#809	pH5pg4100 15.810 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (15.810 nt) 5'-CGAGTGACCATTACTGACGC-3'
#810	pH5pg4100 16.410 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (16.410 nt) 5'-CATTAGTGCTATGACTCAGGG-3'
#811	pH5pg4100 17.120 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (17.120 nt) 5'-GCGACTGGAAGATGTCTTGG-3'
#812	pH5pg4100 17.701 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (17.701 nt) 5'-GTGGTTCTGCAGATATGGCC-3'
#813	pH5pg4100 18.269 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (18.269 nt) 5'-CAACAAAAGGTGGTAGATGGC-3'

Nr.	Bezeichnung	Sequenz
#814	pH5pg4100 18.838 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (18.838 nt) 5'-CCAGAGGAGCTGCTGAGCC-3'
#815	pH5pg4100 19.338 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (19.338 nt) 5'-GTATTCAAATAGGTGTCAAAGG-3'
#816	pH5pg4100 20.005 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (20.005 nt) 5'-TCCATTGGTGATAGAACCAGG-3'
#817	pH5pg4100 20.621 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (20.621 nt) 5'-CGAGTGGAACTTCAGGAAGG-3'
#818	pH5pg4100 21.217 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (21.217 nt) 5'-GCTTCTATATCCCAGAGAGC-3'
#819	pH5pg4100 21.779 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (21.779 nt) 5'-CAGTGAGCAGGAAGTCAAAGC-3'
#820	pH5pg4100 22.332 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (22.332 nt) 5'-CAGTGCGCAGATTAGGAGC-3'
#821	pH5pg4100 22.903 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (22.903 nt) 5'-GACCGTGCCCGGTCTGGG-3'
#822	pH5pg4100 23.481 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (23.481 nt) 5'-CGTGGTACTTGTCCATCAGC-3'
#823	pH5pg4100 24.100 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (24.100 nt) 5'-GGAGTCAGTCGAGAAGAAGG-3'
#824	pH5pg4100 24.627 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (24.627 nt) 5'-GCAAGATACCCCTATCCTGC-3'
#825	pH5pg4100 25.186 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (25.186 nt) 5'-GCACTACACCTTTCGACAGG-3'
#826	pH5pg4100 25.768 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (25.768 nt) 5'-GCGGTGACGGTCTACTGG-3'
#827	pH5pg4100 26.330 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (26.330 nt) 5'-GGACATGATGGAAGACTGGG-3'
#828	pH5pg4100 26.932 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (26.932 nt) 5'-GGATTTTCCCCTCTGTATGC-3'
#829	pH5pg4100 27.475 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (27.475 nt) 5'-GTGGTACTTCCCAGAGACGC-3'
#830	pH5pg4100 28.097 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (28.097 nt) 5'-GCTAGTTGAGCGGGACAGG-3'
#831	pH5pg4100 28.719 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (28.719 nt) 5'-CAAGACATGGTTAACTTGCACC-3'
#832	pH5pg4100 29.309 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (29.309 nt) 5'-CAATGGGTTTCAAGAGAGTCC-3'
#833	pH5pg4100 29.861 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (29.861 nt) 5'-CGTAGCAACTGGTCCAGG-3'
#834	pH5pg4100 30.401 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (30.401 nt) 5'-GTGGACCACACCAGCTCC-3'
#835	pH5pg4100 30.955 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (30.955 nt) 5'-CGTTTGTGTTATGTTCAACGTG-3'
#836	pH5pg4100 31.889 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (31.889 nt) 5'-CCATGGATCATCATGCTCG-3'
#837	pH5pg4100 32.937 nt	5'-Sequenzieroligonukleotid zur Überprüfung des Ad5-Bacmids pH5pg4100 (32.937 nt) 5'-CCGTAGGTCCCTTCGACGGG-3'

B.7 Eukaryontische Zelllinien und Nährmedien

B.7.1 Eukaryontische Zelllinien

Für alle nachfolgend beschriebenen Transfektionsexperimente mit eukaryontischen Expressionsplasmiden und Infektionen mit verschiedenen von Ad5 abgeleiteten Adenoviren wurden die adhärent wachsenden und nachfolgend aufgelisteten Säugerzellen verwendet.

Säugerzellen	Beschreibung
H1299	Humane, p53-negative Zelllinie aus einem Lungenkarzinom (Mitsudomi <i>et al.</i> , 1992)
A549	Humane Zelllinie aus einem Lungenkarzinom, p53-Wildtyp (Giard <i>et al.</i> , 1973)
911	Humane, Ad5-transformierte embryonale Retinoblastomzelllinie (Graham <i>et al.</i> , 1977)
HeLa	Zelllinie aus einem HPV18-positiven menschlichen Gebärmutterhalskarzinom, Wildtyp p53 (Gey <i>et al.</i> , 1952)
BRK	Primäre Nierenzellen aus 5 Tage alten <i>Sprague-Dawley</i> -Ratten.
BRK1	Nach Transfektion mit pcDNA3-Vektor entstandene immortalisierte Rattenzelllinie
CHO-D422	<i>Chinese hamster ovary</i> (CHO)-D422-Zelllinie (Bradley und Letovanec, 1982)
B6 MEF	Wildtyp-Mausembryofibroblasten (MEF) (von Andrew Kung, Dana-Faber-Institut, Harvard Medical School, USA)
PML-/- MEF	Spontan immortalisierte, PML-negative Mausembryofibroblasten (von Hüseyin Sirma, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg)
5/15-1 MEF	p300-negative Mausembryofibroblasten (von Andrew Kung, Dana-Faber-Institut, Harvard Medical School, USA)

B.7.2 Kulturbedingungen für eukaryontische Zellen

Die Kultivierung adhärenter Säugerzellen unter Standardbedingungen erfolgte in DMEM-Medium (*Dulbecco's Mod Eagle Medium* mit (+) L-Glutamin; GIBCO/BRL GmbH, Eggenstein), das mit 10% (v/v) inaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS; GIBCO/BRL, Eggenstein) und mit einem Antibiotikagemisch bestehend aus Penizillin und Streptomycin (PAN-SYSTEMS, Aidenbach) in einer Endkonzentration von 100 µg/mL bzw. 50 µg/mL angereichert wurde,

bei 37°C in einer Atmosphäre mit 7% CO₂-Gehalt. Die Inaktivierung des FKS erfolgte bei 56°C für 30 min.

B.8 Gewinnung und Kultivierung primärer Rattennierenzellen

Für die Durchführung so genannter Transformationstests (B.17) wurden primäre Rattennierenzellen aus 5 bis 6 Tage alten *Sprague-Dawley*-Ratten (CHARLES RIVER, Kißleg) gewonnen. Hierzu wurden die Nieren unter semisterilen Bedingungen entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in einem 50 mL Reaktionsgefäß (FALCON, Heidelberg) mit sterilem PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, Sambrook *et al.*, 1989) bei RT aufbewahrt. Die Nieren wurden dann unter sterilen Bedingungen mit einem Skalpell mechanisch zerkleinert. Für die Gewinnung von Einzelzellen wurden die Gewebestücke mit Kollagenese/Dispase (ROCHE, Mannheim) in einer Endkonzentration von 1 mg/mL in PBS für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wiederholt sedimentiert (500 x g, 10 min, 4°C) und zwischendurch mit sterilem PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Zellen in DMEM-Medium unter Standardbedingungen inkubiert.

B.9 Transfektion von adhärennten Eukaryontenzellen

B.9.1 Transfektion mittels CaHPO₄-Präzipitation

Adhärennte Zellen lassen sich effizient mit der CaHPO₄-Präzipitations-Methode (Graham und van der Eb, 1973) transfizieren, bei der das entstehende CaHPO₄-DNA-Präzipitat über einen noch nicht geklärten Mechanismus von der Zelle aufgenommen wird.

Hierzu wurden am Vortag 3×10^5 Zellen pro 3,5cm-Schale (FALCON, Heidelberg) bzw. 1×10^6 Zellen pro 15cm-Schale (FALCON, Heidelberg) in 3 mL bzw. 10 mL DMEM-Medium ausgesät und für 24 h inkubiert. Mindestens 1 h vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Für die Transfektion der Säugerzellen in einer 3,5cm-Schale wurden je 5 bis 10 µg Säulen-gereinigte Plasmid-DNA mit 30 µL 2,5 M CaCl₂ (sterilfiltriert) in einem Volumen von 300 µL vereint und unter Vortexen tropfenweise zu 300 µL des 2x HeBS (HEPES-gepufferte Kochsalzlösung)-Puffers [8,2 g NaCl, 5,95 g HEPES, 0,105 g Na₂HPO₄ in 500 mL H₂O_{bid.} und

pH 7,05!] pipettiert. Für die Transfektion der Zellen in einer 15cm-Schale wurden insgesamt 30 µg Plasmid-DNA, 50 µL 2,5 M CaCl₂ (sterilfiltriert) und 500 µL des 2x HeBS-Puffers verwendet. Während des 20-minütigen Inkubationschrittes bei RT bildete sich das Präzipitat aus, das auf die zu transfizierenden Zellen gegeben wurde. Anschließend wurden die Zellen zunächst für 16 h und, nach erneutem Wechsel des Mediums, für insgesamt 48 h im Brutschrank kultiviert. Die für die Transfektionen benötigten Expressionskonstrukte sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Nr.	Bezeichnung	Fremdgen	Vektor	Referenz
#729	pCDNA3-HA E4ORF3 Wt	Ad5 E4ORF3 Wt	pCDNA3-HA	Stammsammlung
#976	pCDNA3-HA E4ORF3/4	Ad5 E4ORF3/4	pCDNA3-HA	Stammsammlung
#892	pCDNA3-HA E4ORF3 K8R	Ad5 E4ORF3 K8R	pCDNA3-HA	Stammsammlung
#782	pCDNA3-HA E4ORF3 L13A	Ad5 E4ORF3 L13A	pCDNA3-HA	Stammsammlung
#1361	pCDNA3-HA E4ORF3 NES	Ad5 E4ORF3 NES	pCDNA3-HA	Diese Arbeit
#784	pCDNA3-HA E4ORF3 Y40A	Ad5 E4ORF3 Y40A	pCDNA3-HA	Stammsammlung
#1379	pCDNA3-HA E4ORF3 EE52/53AA	Ad5 E4ORF3 EE52/53AA	pCDNA3-HA	Diese Arbeit
#1380	pCDNA3-HA E4ORF3 N82A	Ad5 E4ORF3 N82A	pCDNA3-HA	Diese Arbeit
#735	pCDNA3-HA E4ORF3 T96A	Ad5 E4ORF3 T96A	pCDNA3-HA	Stammsammlung
#880	pCDNA3-HA E4ORF3 GG97/98AA	Ad5 E4ORF3 GG97/98AA	pCDNA3-HA	Stammsammlung
#1150	pCDNA3-HA E4ORF3 GG/Stopp	Ad5 E4ORF3 GG/Stopp	pCDNA3-HA	Stammsammlung
#785	pCDNA3-HA E4ORF3 L103A	Ad5 E4ORF3 L103A	pCDNA3-HA	Stammsammlung
#1381	pCDNA3-HA E4ORF3 L106A	Ad5 E4ORF3 L106A	pCDNA3-HA	Diese Arbeit
#779	pCDNA3-HA E4ORF3 L111A	Ad5 E4ORF3 L111A	pCDNA3-HA	Stammsammlung
#1382	pCDNA3-HA E4ORF3 L115A	Ad5 E4ORF3 L115A	pCDNA3-HA	Diese Arbeit
#96	pCMV-E1A 12S	Ad5 E1A 12S	pCMVneo	(Bagchi <i>et al.</i> , 1990)
#737	pE1A	Ad5 E1A	pML	Stammsammlung
#608	pXC15	Ad5 E1	pML	(Logan und Shenk, 1984)
#1002	pCDNA3 p300	p300	pCDNA3	Stammsammlung
#1566	pCDNA3 PML IV	PML IV	pCDNA3	(Xu <i>et al.</i> , 2004)
#1567	pCDNA3- PML IV	PML IV	pCDNA3	Xu <i>et al.</i> , 2004:

B.9.2 Transfektion mittels Liposomen-Methode

Kationische Liposome sind aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen ihrer positiven Ladungen mit den negativ-geladenen Phosphatresten der DNA in der Lage, an diese zu binden und Komplexe zu bilden. Diese können dann über eine Interaktion mit der ebenfalls negativ-geladenen und hydrophoben Zellmembran von der Zelle aufgenommen werden.

Hierzu wurden adhärenente Säugerzellen in einer 3,5cm-Schale (FALCON, Heidelberg) in DMEM-Medium unter Standardbedingungen bis zu einer Zelldichte von 80 bis 90% kultiviert. Vor der Transfektion wurde das Medium durch Serum- und Antibiotika-freies DMEM-Medium ersetzt. Für die Transfektion wurden pro 3,5cm-Schale 1 bis 2 µg Säulen-gereinigter Plasmid-DNA und 2,5 µL Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 (INVITROGEN, Karlsruhe) jeweils in 250 µL Serum-freien DMEM-Medium verdünnt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT wurden die Lipofectamine™ 2000™-Lösung und die DNA-Lösung vereint und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Transfektionslösung tropfenweise auf die Zellen gegeben und diese für 48 h bei 37°C inkubiert.

B.9.3 Transfektion mittels Elektroporation

Durch die elektrischen Impulse eines sich entladenden Kondensators wird kurzzeitig ein elektrisches Feld erzeugt, das vorübergehend Läsionen in der Zellmembran hervorruft. Auf diese Weise kann Plasmid-DNA sehr effizient in Säugetierzellen eingebracht werden. Mit Hilfe der Elektroporation können daher hohe Transformationsraten erzielt werden.

Zu diesem Zweck wurden PML-/- MEF-Zellen in DMEM-Medium unter Standardbedingungen kultiviert. Für die Transfektion wurden pro Ansatz 1×10^7 Zellen in 200 µL Serum-freien DMEM-Medium aufgenommen. Nach Zugabe von je 5 µg Säulen-gereinigter Plasmid-DNA wurde der Ansatz zu 250 µL PBS gegeben, das bereits in einer 0,5 mL Küvette vorgelegt war. Die Elektroporation erfolgte schließlich bei 260V und 1050 µF mit Hilfe des Elektroporationsgerätes *Easyject* (EQUIBIO, Nottingham, Großbritannien) nach Angaben des Herstellers. Nach der Transfektion wurden die Zellen in eine 15cm-Schale (FALCON, Heidelberg) gegeben. Anschließend wurden die Zellen zunächst für 16 h und, nach erneutem Wechsel des Mediums, für insgesamt 48 h im Brutschrank kultiviert.

B.10 Adenoviren

B.10.1 Gewinnung von Virus aus Bacmid-DNA

Säulen-gereinigte Bacmid-DNA wurde durch Spaltung mit der Restriktionsendonuclease *PacI* vom bakteriellen Vektoranteil befreit. Nach Fällung der linearisierten DNA mit 1/10 Volumen 3 M NaOAc und 1 Volumen Isopropanol wurden je 2×10^6 911-Zellen mit je 30 μg gespaltener Bacmid-DNA mittels CaHPO_4 -Präzipitations-Methode (B.9.1) transfiziert und unter Standardbedingungen kultiviert. Nach ca. 16 h wurde das Medium gewechselt und die transfizierten Zellen wurden maximal drei Tage inkubiert. Hatten sie sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht vom Boden der 15cm-Schale (FALCON, Heidelberg) gelöst, wurden die Zellen mit einem Zellschaber (SARSTEDT, Nümbrecht) abgeschabt, in einem 50 mL Reaktionsgefäß (FALCON, Heidelberg) sedimentiert (500 x g, 5 min, RT) und in 5 mL Serum-freien DMEM-Medium aufgenommen. Da 90% der Viren mit den Zellen assoziiert bleiben (Jakoby und Pastan, 1979) wurden die Zellen viermal mit Hilfe eines *freeze- and thaw*-Schrittes aufgeschlossen. Nach anschließender Zentrifugation (4.400 x g, 10 min, RT) wurden erneut 2×10^6 911-Zellen pro 15cm-Schale (FALCON, Heidelberg) mit dem so gewonnenen Virusüberstand infiziert (B.10.5). Dieser Vorgang wurde solange wiederholt (in der Regel 2 bis 5 Mal) bis die infizierten Zellen die typischen zytopathischen Effekte zeigten und sich vom Boden ablösten. Daraufhin wurden die Zellen wie oben beschrieben geerntet und aufgeschlossen. Für die Re-infektion wurden nun 1×10^7 911-Zellen in 15cm-Schalen (FALCON, Heidelberg) mit dem so erhaltenen Virusüberstand infiziert. Da dieser Überstand schon eine beträchtliche Menge an Adenoviren enthielt, konnten die infizierten Zellen schon bald nach der Infektion geerntet, lysiert und für die Herstellung hochkonzentrierter Virusbestände (B.10.2) verwendet werden.

B.10.2 Herstellung und Lagerung von hochkonzentrierten Virusbeständen

Zur Gewinnung hochkonzentrierter Virusbestände wurden je 1×10^7 911-Zellen aus insgesamt sechs 15cm-Schalen (FALCON, Heidelberg) mit 10 ffu/Zelle infiziert. Die Zellen, die zwei bis drei Tage nach der Infektion einen deutlichen zytopathischen Effekt zeigten und sich vom Schalenboden lösten, wurden in einem 50 mL Reaktionsgefäß (FALCON, Heidelberg) sedimentiert (500 x g, 5 min, RT) und nach einem Waschschrift mit PBS/ $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ [4 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 pH 7,4, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2] in

6 mL 100 mM HEPES pH 7,2 resuspendiert. Nach Aufschluss der Zellen (*freeze and thaw*) und Entfernen der Zelldebris (4.400 x g, 10 min, RT) wurde der Virusüberstand auf einen diskontinuierlichen CsCl-Gradienten gegeben. Zur Herstellung des CsCl-Gradienten wurde zuvor in einem 13 mL SW-40 Ultrazentrifugen-Röhrchen (BECKMAN, Fullerton, Kalifornien, USA) 2 mL einer 1,4 g/mL CsCl-Lösung [verdünnt in 1x HBS (*HEPES-buffered saline*; 25 mM HEPES pH 7,4, 137 mM NaCl, 3 mM KCl)] vorgelegt und dann mit 2,5 mL einer 1,25 g/mL CsCl-Lösung (verdünnt in 1x HBS) vorsichtig überschichtet. Nach der anschließenden Ultrazentrifugation (35.000 Upm., 1 h, 15°C; Centrikon T-2170, KONTRON INSTRUMENTS, Landshut) des Virusüberstandes im Ausschwenkrotor SW40 bandierten die Viruspartikel ihrer Dichte entsprechend an der Grenzschicht der beiden CsCl-Lösungen. Diese Viruspartikel, deren Anzahl mittels Titration bestimmt wurde (B.10.3), bildeten den hochkonzentrierten CsCl-gereinigten Virusbestand und wurden bei -80°C gelagert. Aus diesen gereinigten Viruspartikeln konnte adenovirale DNA isoliert (B.10.4) und anschließend mittels Restriktionsspaltung mit *HindIII* und/oder Sequenzierung auf ihre Richtigkeit hin überprüft werden.

Eine Alternative zu CsCl-gereinigten Virusbeständen stellen ungereinigte Virusbestände dar. Hierfür wurden die infizierten Zellen wie oben beschrieben geerntet, gewaschen, aber dann in 5 mL Serum-freien DMEM-Medium aufgeschlossen (*freeze and thaw*). Nach anschließender Zentrifugation (4.400 x g, 10 min, RT) wurde der Virusüberstand mit steriler Glycerin-Lösung [10% (v/v) Endkonzentration] versetzt. Nach Bestimmung der Virustiter (B.10.3) konnten diese ungereinigten Virusbestände, die kein toxisches CsCl enthalten, ebenfalls bei -80°C über lange Zeit gelagert werden.

B.10.3 Titerbestimmung von Virusbeständen

Die Anzahl infektiöser Viruspartikel (Titer) ungereinigter und CsCl-gereinigter Virusbestände wurde immunhistochemisch bestimmt als Fluoreszenz-bildende Einheiten (*fluorescent-forming units*; ffu) pro Milliliter (ffu/mL) angegeben. Im Gegensatz zum *plaque assay* (Jakoby und Pastan, 1979), bei dem die Fähigkeit der Viren zu infizieren, anschließend die Zellen zu lysieren und *Plaques* im konfluenten Zellrasen zu bilden, gemessen wird, konzentriert sich die Bestimmung der ffu nur auf die frühen Infektionsereignisse, repräsentiert durch den immunhistochemischen Nachweis des frühen adenoviralen E2A-72kDa-Proteins.

Dazu wurden je 5×10^5 911-Zellen pro 3,5cm-Schale (FALCON, Heidelberg) ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert. Nach etwa 12 h wurden die Zellen nach einem Wasch-

schritt mit vorgewärmten PBS/Ca²⁺Mg²⁺ mit je 1 mL einer Virusverdünnung (10⁻³ bis 10⁻⁶ in Infektionspuffer [2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 0,2% (v/v) FKS (GIBCO/BRL, Eggenstein), 1% (v/v) Penizillin/Streptomycin (PAN-SYSTEMS, Aidenbach) in PBS] infiziert. Die Zellen wurden dann 1 h bei 37 °C inkubiert und währenddessen alle 15 min vorsichtig geschwenkt, um die Virusadsorption zu gewährleisten. Im Anschluss daran wurde die Viruslösung durch 3 mL DMEM-Medium ersetzt, und die Zellen wurden für weitere 24 h bei 37°C kultiviert.

Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal mit PBS/Ca²⁺Mg²⁺ für 5 min gewaschen und mit eiskaltem Methanol für 15 min bei -20°C fixiert. Nach dem Entfernen des Methanols wurden die Zellen 5 min bei RT getrocknet und konnten dann entweder bei -20°C gelagert oder sofort für die Immunfluoreszenz-Analyse verwendet werden.

Die Absättigung freier und unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen dreimal 5 min mit je 3 mL TBS-BG-Puffer [20 mM Tris/HCl pH 7,6, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,05% (v/v) Tween20, 0,05% (w/v) Natriumazid, 0,5% (w/v) Glyzin, 0,5% (w/v) BSA] gewaschen. Nach dem Entfernen der Blockierungslösung wurden die Zellen mit 1 mL der entsprechenden 1:10-Verdünnung des primären Antikörpers B6-8 (α-E2A-72kDa) in TBS-BG für 3 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (je 10 min) mit TBS-BG erfolgte die Inkubation mit dem sekundären, Fluoreszein-Isothyozyanat (FITC)-markierten Antikörper (1:1.000 in TBS-BG) für 3 h in einer dunklen Kammer. Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-BG wurden die Zellen mit 1 mL TBS-BG versetzt. Die Zellen konnten nun für 48 h ohne Signalverluste bei 4°C gelagert werden. Bei der anschließenden mikroskopischen Analyse wurde die Anzahl angefärbter, infizierter Zellen mit Hilfe des inversen Immunfluoreszenzmikroskops (ZEISS, Oberkochen) bestimmt. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Verdünnung (10⁻³ bis 10⁻⁶) der Viruslösung und des Vergrößerungsfaktors des Mikroskops konnte somit die Anzahl infektiöser Viruspartikel pro mL Viruslösung berechnet werden. Die für die Immunfluoreszenz-Analysen verwendeten Antikörper und die jeweils eingesetzten Verdünnungen (in TBS-BG) sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Nomenklatur	eingesetzte Verdünnung	Beschreibung des Antikörpers
α-E2A-72kDa (B6-8)	1:10	Monoklonaler Antikörper gegen das E2A-72kDa-Protein von Ad5 (Maus, Reich <i>et al.</i> , 1983)
Alexa Fluor-α-Maus IgG	1:10.000	Alexa Fluor-gekoppelter Antikörper aus Maus, (MOLECULAR PROBES EUGENE, Leiden, Niederlande)

B.10.4 Isolierung adenoviraler DNA aus gereinigten Viruspartikeln

Zur Isolierung adenoviraler DNA wurden 300 μL der CsCl-gereinigten Viruspartikel (B.10.2) mit TE-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 500 μL gebracht und in *Slide-A-Lyser Dialyse*-Rahmen (PIERCE, Rockford, USA) gegen PBS bei 4°C ÜN dialysiert.

Am nächsten Tag erfolgte der enzymatische Aufschluss der dialysierten Viruspartikel mit 0,5% (w/v) SDS und 0,2 mg/mL Proteinase K für mindestens 4 h oder ÜN bei 37 °C. Für die Extraktion der DNA wurde die DNA-Lösung zusammen mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) in einem 2,0 mL *Phase Lock Gel*® (PLG)-Reaktionsgefäß (EPPENDORF, Hamburg) für 5 min auf dem Drehrotor (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) inkubiert. Das PLG verhinderte die Kontamination der DNA-haltigen Phase mit Interphasen-Proteinen, indem es durch seine spezielle Gel-Matrix wässrige und organische Phase wirkungsvoll voneinander trennen kann. Nach einem Zentrifugationsschritt (13.000 x g, 5 min, 4°C) wurde die DNA-haltige, obere Phase in ein 2,0 mL Reaktionsgefäß (EPPENDORF, Hamburg) überführt. Im Anschluss daran erfolgte die Fällung der adenoviralen DNA mit 1/10 Volumen 3 M NaOAc und 0,7 Volumen Isopropanol (21.000 x g, 20 min, RT). Nach einem Waschschrift mit 75%-igen EtOH und kurzem Trocknen bei RT wurde die DNA in 10 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgenommen und bei 4°C gelagert. Die adenovirale DNA konnte dann nach Bestimmung der DNA-Konzentration und nach Restriktionsspaltung mit *HindIII* durch Sequenzierung unter Verwendung der unter B.6 aufgeführten Sequenzieroligonukleotide überprüft werden.

B.10.5 Infektion von Säugierzellen mit Adenoviren

Für die Infektion mit Adenoviren wurden 2×10^6 Zellen pro 15cm-Schale (FALCON, Heidelberg) unter Standardbedingungen kultiviert und bei einer Konfluenz von 60 bis 80% infiziert.

Hierzu wurden die Zellen nach dem Waschen mit vorgewärmten PBS in 3 mL Serumfreien DMEM-Medium mit entsprechender Anzahl an Viruspartikel unter wiederholtem Schwenken für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Infektionslösung abgenommen und durch DMEM-Medium ersetzt. Die Zellen wurden dann entsprechend des Versuchsansatzes für 12 bis 72 h unter Standardbedingungen weiter im Brutschrank inkubiert. Die für die Infektionen verwendeten Adenoviren sind in der nachfolgenden Tabelle auf der nächsten Seite dargestellt:

Bezeichnung	Merkmal
<i>dl309</i>	Wildtyp Ad5 mit einer 1863 Bp langen Deletion (nt 28602 bis 30465) des E3-Leserahmens (Jones und Shenk, 1979).
<i>H5pg4100</i>	Ad5 Wildtyp-Virus mit einer 1863 Bp langen Deletion (nt 28602 bis 30465) des E3-Leserahmens (Groitl <i>et al.</i> , 2005).
<i>H5pm4112</i>	E4ORF3-Virusmutante mit einem Aminosäureaustausch an Position 8 (K8R) im <i>pg4100</i> Rückgrat (diese Arbeit).
<i>H5pm4111</i>	E4ORF3-Virusmutante mit zwei Aminosäureaustausche an Position 97 und 98 (GG97/98AA) im <i>pg4100</i> Rückgrat (diese Arbeit).
<i>H5pm4113</i>	E4ORF3-Virusmutante mit Stopp-Kodon hinter dem GG-Motiv an Position 97 und 98 (GG/Stopp) im <i>pg4100</i> Rückgrat (diese Arbeit).
<i>H5pm4110</i>	E4ORF3-Virusmutante mit einem Aminosäureaustausch an Position 103 (L103A) im <i>pg4100</i> Rückgrat (diese Arbeit).
<i>H5pm4114</i>	E4ORF3-Virusmutante mit einem Aminosäureaustausch an Position 111 (L111A) im <i>pg4100</i> Rückgrat (diese Arbeit).
<i>E4inORF3</i>	E4ORF3-Virusmutante mit einer 8 Bp-Insertion am Aminoterminus (Huang und Hearing, 1989).

B.11 Ernte und Aufarbeitung der Zellen nach Transfektion und Infektion

Zur Analyse der transienten Expression viraler Proteine in eukaryontischen Zellen mussten die Zellen geerntet und aufgearbeitet werden.

Der Zellrasen wurde mit PBS gewaschen und in 1mL PBS mit Hilfe eines Zellschabers quantitativ von der Oberfläche der 3,5cm-Schale gelöst. Die Zellen wurden bei 1.000 x g pelletiert, ein weiteres Mal mit PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation zur Lagerung bei -80°C eingefroren.

Zur Aufarbeitung der Zellen wurde das Zellpellet in 100 µL RIPA (*radio immunoprecipitation assay*)-Lysispuffer [0,5% (v/v) SDC (*sodium deoxycholate*), 1% (v/v) Nonidet P-40, 0,1% (w/v) SDS (*sodium dodecyl sulfate*), 5mM EDTA, 150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8,0] resuspendiert und für 30 min auf Eis lysiert. Zum vollständigen Zellaufschluss wurden die Zellextrakte zweimal einem *freeze and thaw*-Schritt unterzogen und mit Ultraschall (*output* 0,60, 0,8 Impulse/s; *Branson Sonifier 450*) behandelt.

B.12 Qualitative Analyse von zellulären und viralen Proteinen

Für die Immunoblotanalyse viraler und zellulärer Proteine in transfizierten oder mit Ad5 infizierten Säugerzellen wurde nach deren Aufschluss die Gesamtproteinmenge quantitativ mit dem *Bradford-Protein-Test* nach Angaben des Herstellers (BIORAD, München) bestimmt. Das chromogene Reagenz dieses Testsystems unterliegt nach Bindung an Proteine einer Farbänderung, die sich photometrisch in einer Absorptionzunahme bei 595 nm äußert. Aus dem Vergleich der gemessenen OD mit den Werten einer BSA-Eichkurve lässt sich die Proteinmenge näherungsweise abschätzen.

Pro Ansatz wurden 50 bis 300 µg Protein mit 2-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer [125 mM Tris/HCl pH 6,8, 4% (w/v) SDS, 20% (w/v) Glycerin, 2% 2-β-Mercaptoethanol, 0,2% Bromphenolblau] versetzt. Nach Denaturierung der Proteine bei 95°C konnten die gewonnenen Zellsate direkt auf das SDS (Natriumdodecylsulfat)-Gel aufgetragen werden.

B.13 Auftrennung von Proteinen mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 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 Eigenladungen so, dass alle Proteine annähernd ihrer Größe entsprechend zur Anode wandern können. Nach Laemmli (Laemmli, 1970) werden die Proteine unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems (Fling und Gregerson, 1986) in einem niederprozentigen Sammelgel konzentriert, bevor diese im Trenngel aufgetrennt werden.

Der Aufbau der verwendeten Gelapparaturen und das Gießen der Gele ist der Beschreibung der Gerätehersteller (BIOMETRA, Göttingen) zu entnehmen, die genaue Zusammensetzung der Gellösungen ist in der Tabelle der folgenden Seite zusammengefasst. Die Elektrophorese erfolgte in einem speziellen SDS-PAGE-Laufpuffer [25 mM Tris/HCl pH 7,5, 190 mM Glyzin, 0,1% SDS] bei 25 mA pro Gel.

	Trenngel 15 %	Trenngel 8 %	Sammelgel 5 %
Protogel™, (30% Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid)	50% (v/v)	27% (v/v)	17% (v/v)
Tris/HCl pH 8,8	250 mM	250 mM	
Tris/HCl pH 6,8			120 mM
SDS (Natriumdodecylsulfat)	0,1%	0,1%	0,1%
TEMED (Tetramethylethylen-diamin)	0,04%	0,06%	0,1%
10% APS (Ammoniumperoxodisulfat)	0,01%	0,01%	0,01%

B.14 Detektion spezifischer Proteine mit Hilfe der *Western Blot*-Analyse

B.14.1 Proteintransfer auf Nitrozellulose: *Western Blot*-Analyse

Der Transfer von aufgetrennten Proteinen aus einem Polyacrylamid-Trenngel auf Nitrozellulose (*Millipore Immobilon NC pure*, MILLIPORE, Bedford) erfolgte in einer *Fast-Blot* „*semidry*“-Apparatur (BIOMETRA, Göttingen) mit dem Towbin-Transferpuffer [200 mM Glyzin, 25 mM Tris/HCl pH 8,3, 0,05% (w/v) SDS, 20% Methanol] nach Angabe des Herstellers für 20 min bis 60 min bei einer Stromstärke von 5 mA/cm².

Die denaturierten Proteine wandern, entsprechend ihrer nach SDS-Behandlung negativen Ladung, in Richtung Anode und werden dadurch auf der Nitrozellulose immobilisiert. Zur Überprüfung des erfolgten Proteintransfers und zur Markierung des Molekulargewichtsstandards (*Precision Plus protein standard*, BIORAD, München) wurden die Proteine reversibel mit Ponceaurot S-Lösung (Sambrook *et al.*, 1989) angefärbt und anschließend durch Waschen mit TTBS-Puffer [*tween-tris buffered saline*: 150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,05% (v/v) Tween 20) oder PBS-Tween [*tween-phosphate buffered saline*: PBS, 0,05% (v/v) Tween 20] wieder entfärbt.

B.14.2 Detektion über eine Enzym/Substrat-vermittelte Chemilumineszenz

Der Nachweis spezifischer und immobilisierter Proteine beruht auf der spezifischen Bindung eines primären, monoklonalen Antikörpers und dessen Erkennung durch einen sekundären, Enzym-konjugierten Antikörper.

Die Oxidation eines Substrates durch das an den sekundären Antikörper gekoppelte Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) führt schließlich zu einer Lichtemission. Chemische Verstärker (Phenol) ermöglichen darüber hinaus eine Erhöhung der Lichtintensität und Verlängerung des Emissionszeitraums.

Die in der Arbeit verwendeten Antikörper und die zum spezifischen Nachweis der immobilisierten Proteine jeweils eingesetzten Verdünnungen (in PBS-Tween) sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst:

Nomenklatur	eingesetzte Verdünnung	Beschreibung des Antikörpers
α -HA (3F10)	1:1.000	Monoklonaler Antikörper gegen das HA-Epitop (Ratte, ROCHE, Mannheim)
α - β -Actin (AC-15)	1:5.000	Monoklonaler Antikörper gegen β -Aktin (Maus, SIGMA, München)
α -p300 (C20)	1:500	Monoklonaler Antikörper gegen den Carboxyterminus des humanen p300-Proteins (Kaninchen, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Heidelberg)
α -p53 (Fl393)	1:1.000	Monoklonaler Antikörper gegen humanes p53-Protein (Kaninchen, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Heidelberg)
α -Azetyl-Lysin	1:1.000	Monoklonaler Antikörper gegen Azetyl-Lysin (Maus, UPSTATE, Lake Placid, USA)
α -E4ORF3 (6A11)	1:10	Monoklonaler Antikörper gegen das E4ORF3-Protein von Ad5 (Ratte, Nevels <i>et al.</i> , 1999b)
HRP- α -Maus IgG	1:5.000	HRP (Meerrettich-Peroxidase)-gekoppelter IgG-Antikörper aus Schaf (AMERSHAM LIFE SCIENCE, Freiburg)
HRP- α -Ratte IgG	1:5.000	HRP-gekoppelter IgG-Antikörper aus Ziege (AMERSHAM LIFE SCIENCE, Freiburg)
HRP- α -Kaninchen IgG	1:5.000	HRP-gekoppelter IgG-Antikörper aus Esel (AMERSHAM LIFE SCIENCE, Freiburg)

Die Absättigung freier und unspezifischer Bindungsstellen auf der Nitrozellulose (*Millipore Immobilon NC pure*, MILLIPORE, Bedford) nach dem Proteintransfer erfolgte für mindestens 1 h bei RT oder ÜN bei 4°C mit einer 5%-igen Magermilch-PBS-Tween-Lösung. Danach wurde der Filter kurz mit PBS-Tween gewaschen, bevor er für 1 h mit der entsprechenden Verdünnung des primären Antikörpers inkubiert, wiederum mit PBS gewaschen und anschließend höchstens 1 h mit dem HRP-gekoppelten Antikörper geschüttelt wurde. Nach mehreren Waschschritten mit PBS-Tween erfolgte der autoradiografische Proteinnachweis über die Substrat-vermittelte Chemilumineszenz nach Angaben des Herstellers (*SuperSignal*®)

West Pico Chemiluminescent Substrate; PIERCE, Rockford, USA) mit Hilfe eines Röntgen-filmes (X-OMAT™ AR, KODAK).

B.15 Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen mittels Koimmunpräzipitation

Der Zweck der Immunpräzipitation besteht in der Isolierung von spezifischen Proteinen und Proteinkomplexen mit Hilfe eines Sepharose-Partikel-gekoppelten Antikörpers. Die Bindung primärer Antikörper an Sepharose-Partikel wird je nach Spezies entweder durch das Protein A (Maus, Kaninchen; SIGMA-ALDRICH CHEMIE, München) oder durch Protein G (Ratte; SIGMA-ALDRICH CHEMIE, München) vermittelt, die beide spezifisch an den Fc-Anteil von Antikörpern binden können. Der an die Sepharose-Matrix gebundene Protein-Antikörper-Komplex kann schließlich aufgrund seines hohen Molekulargewichts durch Zentrifugation sedimentiert werden. Der Nachweis des isolierten Zielproteins und/oder dessen mögliche Bindungspartner erfolgt schließlich mittels *Western Blot*-Analysen mit den entsprechenden Antikörpern.

Pro Ansatz wurden dazu je 3 mg lyophilisierte Protein A- bzw. G-Sepharose vor ihrer eigentlichen Verwendung in 100 µL RIPA-Lysepuffer 1 h bei 4°C auf einem Drehrotor (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) äquilibriert. Die äquilibrierte Sepharose wurde nach einem Zentrifugationsschritt (5.200 x g, 5 min) bei 4°C entweder direkt in 100 µL Hybridom-Überstand oder in 100 µL PBS sowie 2 µg gereinigten Antikörper aufgenommen. Die Bindung des Antikörpers an die Sepharose fand während einer zweistündigen Inkubation bei 4°C auf einem Drehrotor statt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die Sepharose wieder in 100 µL Lysepuffer aufgenommen. Die Immunpräzipitation erfolgte nach Zugabe der entsprechenden Menge an Zellextrakte (normalerweise mit einer Gesamtproteinmenge von 0,5 bis 2 mg) ÜN bei 4°C. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurde der Zellextrakt zuvor mit je 100 µL der äquilibrierten Protein A- bzw. G-Sepharose für 1 h inkubiert und nach Zentrifugation eingesetzt. Nach erfolgter Immunpräzipitation wurde der isolierte Protein-Antikörper-Komplex dreimal mit RIPA-Lysepuffer gewaschen und nach dem letzten Zentrifugationsschritt direkt in 50 µL zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer [125 mM Tris/HCl pH 6,8, 4% (w/v) SDS, 20% (w/v) Glyzerin, 2% 2-β-Mercaptoethanol, 0,2% (w/v)

Bromphenolblau] aufgenommen und bei 95°C erhitzt. Anschließend konnten die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western Blot* weiter analysiert werden.

B.16 Immunfluoreszenz-Analysen

Für die Untersuchung von viralen und auch zellulären Proteinen hinsichtlich ihrer Lokalisation/Kolokalisation in Säugerzellen wurden Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt. Die dafür verwendeten Antikörper und die jeweils eingesetzten Verdünnungen (in PBS und/oder TBS-BG) sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst.

Nomenklatur	eingesetzte Verdünnung	Beschreibung des Antikörpers
α -HA (3F10)	1:100	Monoklonaler Antikörper gegen das HA-Epitop (Ratte, ROCHE, Mannheim)
α -p300 (C20)	1:50	Polyklonaler Antikörper gegen den Carboxyterminus des humanen p300-Proteins (Kaninchen, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Heidelberg)
α -E4ORF3 (6A11)	unverdünnt	Monoklonaler Antikörper gegen das E4ORF3-Protein von Ad5 (Ratte, Nevels <i>et al.</i> , 1999b)
FITC- α -Ratte IgG	1:100	Fluoreszein-Isothyozyanat (FITC)-gekoppelter Antikörper aus Ziege, Affinitätsgereinigtes F(ab)2-Fragment (DIANOVA, Hamburg)
FITC- α -Kaninchen IgG	1:100	FITC-gekoppelter Antikörper aus Ziege, Affinitätsgereinigtes F(ab)2-Fragment (DIANOVA, Hamburg)
TR- α -Ratte IgG	1:100	<i>TexasRed</i> (TR)-gekoppelter Antikörper aus Ziege, Affinitätsgereinigtes F(ab)2-Fragment (DIANOVA, Hamburg)

Für die Immunfluoreszenz-Analysen wurden zunächst Säugerzellen in 3,5cm-Schalen (FALCON, Heidelberg) auf sterilen Deckgläsern unter Standardbedingungen kultiviert. 48 h nach Transfektion der Zellen mit Hilfe der CaHPO₄-Präzipitation (B.9.1) oder mittels Lipofectamine™ 2000 (B.9.2) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 15 min in eiskaltem Methanol bei -20°C fixiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen bei RT getrocknet und konnten dann entweder bei -20°C gelagert oder sofort für die Immunfluoreszenz-Analyse verwendet werden.

Die Absättigung freier und unspezifischer Bindungsstellen erfolgte für 30 min bei RT mit TBS-BG-Puffer (B.10.3). Nach dem Entfernen der Blockierungslösung und einem Waschschritt mit PBS wurden die Zellen mit der entsprechenden Verdünnung des primären Anti-

körpers in PBS für 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen sekundären, Fluoreszenz-markierten Antikörper. Zur Anfärbung des Chromatins wurden 0,5 µg/µL DAPI (4',6-Diamidin-2'-Phenylindol Dihydrochlorid) zugesetzt. Nach weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Zellen mit *Glow Mounting Medium* nach Angaben des Herstellers (ENERGENE, Regensburg) versiegelt und konnten letztendlich einer mikroskopischen Analyse unterzogen werden.

B.17 Transformation primärer Rattennierenzellen

Mit Hilfe des Transformationstests wurde das transformierende Potenzial des E4ORF3-Proteins in primären Zellen untersucht. Primäre Zellen besitzen lediglich eine begrenzte Teilungsfähigkeit. Zellen hingegen, welche durch die Expression adenoviraler Proteine transformiert wurden, zeichnen sich durch ein nahezu unbegrenztes Wachstum aus.

Für die Versuche wurden am Vortag 3×10^6 primäre Rattennierenzellen auf 15cm-Schalen (FALCON, Heidelberg) ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert. Am nächsten Tag wurden diese Zellen mit den entsprechenden Expressionskonstrukten mittels der CaHPO₄-Präzipitations-Methode (B.9.1) transfiziert.

Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen nach einem Waschschriff mit PBS mittels Trypsin/EDTA-Lösung (PAN-SYSTEMS, Aidenbach) vom Schalenboden abgelöst und in jeweils drei 15cm-Schalen (FALCON, Heidelberg) ausgesät. Die Zellen wurden daraufhin weiterhin unter Standardbedingungen kultiviert. In regelmäßigen Abständen wurde dabei das Medium gewechselt. Nach fünf bis sechs Wochen schließlich bildeten transformierte Zellen mehrschichtige Zellkolonien (*Foci*) aus, die mit Kristallviolett-Färbelösung [1% (w/v) Kristallviolett, 25% (v/v) Methanol] angefärbt und anschließend ausgezählt wurden.

B.18 Analyse des mutagenen Potenzials verschiedener E4ORF3-Proteine

Zur Untersuchung des „hit & run“-Mechanismus wurden verschiedene E4ORF3-Genprodukte von Ad5 dem HGPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase)-Mutagenesetest unterzogen. Dazu wurden die entsprechenden E4ORF3-Polypeptide in CHO (*chinese hamster ovary*)-D422-Zellen transient exprimiert. Diese Zellen, die hemizygot für das *hgp*rt-Gen sind, erlauben eine einfache phänotypische Selektion von Mutanten.

Zu diesem Zweck wurden zunächst 1×10^5 CHO-D422-Zellen pro 15cm-Schale (FALCON, Heidelberg) in einem Purin-freien Medium (MEM Alpha Medium; GIBCO/BRL, Eggenstein) mit 10% (v/v) inaktiviertem FKS (GIBCO/BRL, Eggenstein) und 1% (v/v) Penizillin/Streptomycin (PAN-SYSTEMS, Aidenbach) bei 37°C kultiviert. Nach einer Inkubation von 48 h wurden diese Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden mittels der CaHPO_4 -Präzipitations-Methode (B.9.1) transfiziert. Für eine effizientere Aufnahme der Plasmid-DNA wurde 6 h nach Transfektion direkt 2 mL einer 10%-igen Glycerinlösung auf die Zellen gegeben. Nach 3 min wurde das Glycerin durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und schließlich durch Medium ersetzt [MEM Alpha Medium, 10% (v/v) FKS, 1% (v/v) Penizillin/Streptomycin]. Nach 12 h wurde das Medium erneut gewechselt. Zum Zweck der Manifestation von Mutationen wurden die Zellen in diesem nicht selektiven Medium für weitere vier Tage bei 37°C inkubiert. Zur anschließenden Selektion der HGPRT-Mutanten wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA-Lösung (PAN-SYSTEMS, Aidenbach) vom Schalenboden abgelöst und 1×10^5 CHO-D422-Zellen in Purin-freiem Medium [MEM Alpha-Medium, 10% (v/v) dialysiertes FKS, 1% (v/v) Penizillin/Streptomycin] in Anwesenheit von 10 μM 6-Thioguanin (2-Amino-6-Mercaptopurin; SIGMA, München) subkultiviert. Gleichzeitig wurden zur Bestimmung der Plattierungseffizienz 1×10^2 Zellen in nicht selektivem Medium inkubiert. Nach einer einwöchigen Inkubation bei 37°C wurden die 6-Thioguanin-resistenten Zellkolonien mit Kristallviolett gefärbt und die Zellkolonien ausgezählt. Ebenso wurde mit den Zellen zur Bestimmung der Plattierungseffizienz verfahren. Die Anzahl der 6-Thioguanin-resistenten Zellkolonien lieferte schließlich die Mutationshäufigkeit.

B.19 Bestimmung der endogenen Histonazetyltransferase-Aktivität

Mit Hilfe dieses indirekten ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)-Testsystems wurde der Einfluss des E4ORF3-Proteins auf die Aktivität verschiedener, endogener Histonazetyltransferasen (HATs) in Zellkernextrakten aus BRK1-Zellen nach Angaben des Herstellers (UPSTATE, Lake Placid, USA) untersucht. Die HAT-Aktivität konnte dabei über den Antikörper-vermittelten Nachweis von Azetyl-Lysin azetylierte Histon H3-Peptide bestimmt werden. Für den Versuch wurden 2×10^6 BRK1-Zellen pro 15cm-Schale (FALCON, Heidelberg) am Vortag unter Standardbedingungen kultiviert und bei einer Zelldichte von 90% mittels der Liposomen-Methode (B.9.2) je 4 μg der verschiedenen E4ORF3-pcDNA-Expressionskonstrukte transfiziert. Nach einer 48-stündigen Inkubation wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen und in 2 mL PBS mit Hilfe eines Zellschabers quantitativ von der Oberfläche der 3,5cm-Schale gelöst. Die Zellen wurden bei $1.000 \times g$ pelletiert und die Zellkernextrakte nach einem modifizierten Protokoll von Dignam (Dignam *et al.*, 1983) präpariert. Dazu wurden die Zellen einer 15cm-Schale in 100 μL Dignam-Puffer A [10 mM HEPES pH 8,0, 1,5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 1 mM DTT] resuspendiert, für 15 min auf Eis inkubiert und schließlich fünfmal durch eine Kanüle (Durchmesser $27 \frac{3}{4}$) gezogen. Nach einer 30-sekündigen Zentrifugation bei $10.000 \times g$ befand sich der zytoplasmatische Anteil im Überstand. Das Sediment bildete die Zellkernfraktion, die in einem milden Lyse-Puffer [50 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 0,5% (v/v) Triton X-100] aufgenommen wurde. Der Kernextrakt konnte daraufhin nach einem *freeze- and thaw*-Schritt und einer Ultraschallbehandlung direkt für den HAT-Versuch eingesetzt werden.

Für den eigentlichen Test der HAT-Aktivität wurde das Biotin-konjugierte, nicht-azetylierte Histon H3-Peptid mit H_2O auf eine Endkonzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gebracht und in einem Volumen von jeweils 100 μL pro Napf in eine Streptavidin-beschichtete 96-Napf ELISA-Platte gegeben. Die Biotin-Streptavidin-Kopplung erfolgte für 30 min bei RT. Nach fünfmaligem Waschen mit je 200 μL TBS [50 mM Tris/HCl pH 7,4, 150 mM NaCl] pro Napf wurden die freien und unspezifischen Bindungsstellen mit 3% (w/v) BSA-Lösung in TBS (BSA-TBS) für 30 min bei 30°C blockiert. Nach weiteren fünf Waschschritten fand bei 30°C für 30 min die Azetylierung der Histon-Peptide nach Zugabe von je 50 μL HAT-Reaktionsansatzes unter geeigneten Pufferbedingungen statt, in dem neben 20 μL Kernextrakt (endogene HATs) auch das für die Modifizierung benötigte Koenzym Azetyl-CoA (100 μM) enthalten ist. Nach erneutem Waschen mit TBS erfolgte der Nachweis der Azetylierung bei

RT für 1,5 h mit 100 μL des Azetyl-Lysin-spezifischen Antikörpers (1:250 in BSA-TBS). Danach wurde jeder Napf mit 100 μL HRP-gekoppelten sekundären Antikörper (1:10.000 in BSA-TBS) versetzt, und die Platte für 30 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit 0,1% (v/v) Tween20 in TBS-Puffer und fünf Waschsritten mit TBS wurde die Färbereaktion mit je 100 μL des Enzymsubstrats Tetramethylbenzidin im Dunkeln bei RT durchgeführt und nach höchstens 10 min durch die Zugabe von 100 μL 1N H_2SO_4 pro Napf schließlich abgestoppt. Die Absorption der im positiven Fall gelben Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem ELISA *Reader* der Firma SLT LABINSTRUMENTS bestimmt.

C Ergebnisse

Obwohl seit der Identifizierung des E4ORF3-Proteins im Jahr 1982 (Sarnow *et al.*, 1982a) schon mehrere zelluläre und virale Interaktionspartner des E4-Proteins nachgewiesen worden sind, werden die genauen und spezifischen Funktionen von E4ORF3 im Viruskontext noch nicht völlig verstanden. Eine Ursache hierfür ist sicherlich ein weiteres frühes Protein E4ORF6, das viele funktionelle Ähnlichkeiten zum E4ORF3-Protein besitzt. Beide E4-Proteine sind nämlich unabhängig voneinander in der Lage, die Virusreplikation zu steigern, die Synthese zellulärer und später viraler Proteine zu regulieren, die Produktion der Nachkommenviren zu erhöhen und Konkatemerbildung viraler Genome zu verhindern (Halbert *et al.*, 1985; Bridge und Ketner, 1989; Huang und Hearing, 1989; Bridge und Ketner, 1990; Weiden und Ginsberg, 1994). Dies ist in der Hauptsache auf die Wechselwirkung beider E4-Proteine mit den gleichen zellulären DNA-Reparaturenzymen [DNA-abhängige Proteinkinase (DNA PK) und Mre11/Rad50/NBS1 (MRN)-Komplex] (Boyer *et al.*, 1999; Stracker *et al.*, 2002) und dem adenoviralen multifunktionalen E1B-55kDa-Protein zurückzuführen (Leppard und Everett, 1999; Nevels *et al.*, 1999a). Da jedoch nach heutigem Kenntnisstand einige der lytischen Funktionen mit denen überlappen, die für die Transformation von primären Zellen verantwortlich sind (zur Übersicht: Täuber und Dobner, 2001a), soll unter Verwendung einfacher In-vitro-Testsysteme und Transformationsversuche spezifische Funktionen von E4ORF3 ermittelt werden.

Ein wesentliches Ziel im Rahmen dieser Arbeit besteht deshalb darin, durch gezielte Mutationsanalysen funktioneller und relevanter Regionen innerhalb des E4ORF3-Proteins für die Interaktion mit zellulären Faktoren zu identifizieren und die daraus gewonnenen Erkenntnisse im viralen Kontext zu überprüfen.

C.1 Identifizierung funktioneller Bereiche des Ad5 E4ORF3-Proteins mittels Mutationsanalysen

Zur genaueren Analyse der Funktionen von Ad5 E4ORF3 in der Transformation und zum Nachweis funktionell relevanter Bereiche des E4ORF3-Polypeptids wurden gezielt Aminosäureaustausche innerhalb des E4ORF3-Proteins vorgenommen. Dazu erfolgten in erster Linie Austausch von Aminosäuren, die in fast allen bisher bekannten E4ORF3-Proteinen verschiedener Serotypen hoch konserviert sind (Abb.C.1).

				K8R	L13A	NES	Y40A					
				* . . . *	* . . . *	* . . . *	* . . . *					
A	Ad12	E4ORF3	1	MKY	CLRM	AVEGALTE	LFNIHGLN	LQ	NOCVQII	QQWKN	ENY	
B	Ad11	E4ORF3	1	MRV	CLRM	VVEGALRDL	LFVMCGLDL	PQ	ELTRII	QGWKA	ENY	
B	Ad35	E4ORF3	1	MRV	CLRM	VVEGALRDL	LFVMCGLDL	PQ	ELTRII	QGWKA	ENY	
C	Ad2	E4ORF3	1	MIR	CLRL	KVEGALEQ	IFTMAGLN	NIRD	LLRDI	LIRWR	ENY	
C	Ad5	E4ORF3	1	MIR	CLRL	KVEGALEQ	IFTMAGLN	NIRD	LLRDI	LRWR	ENY	
D	Ad9	E4ORF3	1	MKV	CLIM	KVEGALWEL	LFHMC	GV	DLHQ	QFVEI	IQGWKN	ENY
D	Ad17	E4ORF3	1	MKV	CLIM	KVEGALWEL	LFNMC	GV	DLHQ	QFVEI	IQGWKN	ENY
F	Ad40	E4orf3	1	MKV	CLRMT	VEGALNKL	LFELHGASL	QEI	LM	VDVLR	RGWQA	ENY

				EE52/53AA
				* . . . *
A	Ad12	E4ORF3	41	LGMVQSGSLMIEEFHDN-AFALLLFIEIRAVALLEAVVEH
B	Ad11	E4ORF3	41	LGMVQECNMMIEELENAPSFGILLFLDVRVEALLEATVEH
B	Ad35	E4ORF3	41	LGMVQECNMMIEELENAPSFGILLFLDVRVEALLEATVEH
C	Ad2	E4ORF3	41	LGMVEGAGMFIIEEIH-PEGFSLYVHLDVRAVCLLEATVQH
C	Ad5	E4ORF3	41	LGMVEGAGMFIIEEIH-PEGFSLYVHLDVRAVCLLEATVQH
D	Ad9	E4ORF3	41	LGMVQECNLMIDEIDGGPAFNVILMLDVRVEPLLEATVEH
D	Ad17	E4ORF3	41	LGMVQECNLMIDEIDGGPAFNVILMLDVRVEPLLEATVEH
F	Ad40	E4ORF3	41	LGITIDCSLMFEDFEEN-AFAMFVFLVVRVPALVEAVIGN

				N82A	GG97/98AA	L103A	T96A	GG/Stopp	L106A	L111A	L115A
				* . . . *	* . . . *	* . . . *	* . . . *	* . . . *	* . . . *	* . . . *	* . . . *
A	Ad12	E4ORF3	80	LENRLQFDLAVIFHQHSGGDRCHLRDLRIQILADRLD							
B	Ad11	E4ORF3	81	LENRISFDLAVLRFHQHSGGERCHLRDLQFEVLRDRLE							
B	Ad35	E4ORF3	81	LENRISFDLAVLRFHQHSGGERCHLRDLQFEVLRDRLE							
C	Ad2	E4ORF3	80	LTNAIICSLAVEFDHATGGERVHLIDLHFEVLDNLLLE							
C	Ad5	E4ORF3	80	LTNAIICSLAVEFDHATGGERVHLIDLHFEVLDNLLLE							
D	Ad9	E4ORF3	81	LENRVGFDLAVCFHQHSGGERLHLRDLHFTIVLRDRLE							
D	Ad17	E4ORF3	81	LENRVGFDLAVCFHQHSGGERCHLRDLHFTIVLRDRLE							
F	Ad40	E4ORF3	80	LENRIFFDLAVIFHQHSGGERCDLRDLHFGSLYNRLE							

Abb.C.1: Aminosäurevergleich von E4ORF3-Polypeptiden verschiedener Serotypen

Grafische Darstellung der Aminosäuresequenzen der Serotypen Ad2, Ad5, Ad9, Ad11, Ad12, Ad17, Ad35 und Ad40, welche unterschiedlichen Subgruppen (A bis D, F) angehören. Konservierte Bereiche sind hier schwarz hinterlegt. Die Aminosäuresequenz von Ad5 E4ORF3 ist mit roten Buchstaben dargestellt, die Aminosäureaustausche in der Ad5 E4ORF3-Sequenz sind mit roten Sternchen markiert. NES: nukleäres Exportsignal.

Gezielte Aminosäureaustausche gegen Alanin in der E4ORF3 Wt-Sequenz lieferten die E4ORF3-Varianten L13A, EE52/53AA, N82A (Stracker *et al.*, 2002) und T96A sowie L103A, L106A, L111A und L115A.

Da bislang für das E4ORF3-Protein weder Modifizierungen (Phosphorylierung, Azetylierung, SUMOylierung) noch bekannte Protein-Motive beschrieben sind, wurde in einem weiteren Ansatz Aminosäuren und -sequenzen innerhalb von Ad5 E4ORF3 so moduliert, dass mögliche Orte für posttranslationale Modifizierungen oder putative Protein-Motive zerstört wurden.

Die Identifizierung von Phosphorylierungsstellen innerhalb der Ad5 E4ORF3-Sequenz erfolgte mit Hilfe des Programms NetPhos 2,0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>; Blom *et al.*, 1999). Die Analyse ergab eine mögliche Phosphorylierung des Tyrosins an Position 40 (Y40) mit einem Wert von 0,78 auf einer Skala von 0 bis 1. Alle anderen in der Sequenz enthaltenen Tyrosine (Y62), Threonine (T18, T81, T96) und Serine (S60, S87) blieben jedoch unter den vom System als signifikant angegebenen Schwellenwert von 0,5 und werden daher mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit nicht phosphoryliert (Abb.C.2). Durch den gezielten Austausch des Tyrosins gegen Alanin (Y40A) sollte daher keine Phosphorylierung des E4ORF3-Proteins mehr möglich sein.

Serin-Phosphorylierung			
Name	As	Kontext	Treffer
E4ORF3	60	EMGF S LYVE	0,017
E4ORF3	87	AIIC S LAVM	0,002

Threonin-Phosphorylierung			
Name	As	Kontext	Treffer
E4ORF3	18	MQIF T MAGL	0,026
E4ORF3	81	VQEL T NAIL	0,007
E4ORF3	96	FDEA T GGER	0,173

Tyrosin-Phosphorylierung			
Name	As	Kontext	Treffer
E4ORF3	40	RDEN Y LGMV	0,781
E4ORF3	62	GFSL Y VELD	0,303

Abb.C.2: Vorhersage potenzieller Phosphorylierungsstellen innerhalb von Ad5 E4ORF3 mit Hilfe des Programms NetPhos 2,0

Darüber hinaus befinden sich am Aminoterminus von Ad5 E4ORF3 mehrere Leucine und hydrophobe Aminosäuren, die aufgrund ihrer Anordnung der Konsensus-Sequenz eines nukleären Exportsignals (NES) $L X_n (F; I; L; V; M) X_n L X (I; L)$ ($n = 2$ bis 3 ; die meisten der

Leucine können durch hydrophobe Aminosäuren ersetzt werden) (Bogerd *et al.*, 1996; Henderson und Eleftheriou, 2000) entsprechen. Proteine, die eine NES-Domäne aufweisen, sind in der Lage, wie bereits 1994 von Meyer und Malim anhand des HIV-1 Rev-Proteins gezeigt wurde (Meyer und Malim, 1994), mit zellulären Exportproteinen (z.B. Crm1) und -faktoren zu interagieren (Bray *et al.*, 1994; Fischer *et al.*, 1994; Pollard und Malim, 1998) und dadurch den mRNA-Transport aber auch die eigene Translokation ins Zytoplasma zu vermitteln. Falls es sich bei diesen hydrophoben Aminosäuren tatsächlich um ein Crm1-abhängiges Exportsignal handelt, sollte deren gezielte Austausch (I16, M19, L22, I24) gegen Alanin eine stärkere Akkumulation von E4ORF3 im Zellkern zur Folge haben.

Schließlich zeigt die Ad5 E4ORF3-Sequenz eine auffallende Ähnlichkeit zu den Aminosäuresequenzen von Ubiquitin (Schlesinger *et al.*, 1975) und den Ubiquitin-ähnlichen Proteinen SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3, ISG15 und NEDD8 (zur Übersicht: Welchman *et al.*, 2005). Insbesondere besitzt E4ORF3 ebenso wie diese zellulären Faktoren ein möglicherweise funktionelles GG-Motiv am Carboxyterminus. Nach der proteolytischen Spaltung dieses Motivs durch spezifische Hydrolasen wird Ubiquitin oder eines der Ubiquitin-ähnlichen Proteine über den nun freien Glycinrest in einem mehrstufigen, ATP-abhängigen Prozess mittels Isopeptid-Bindung an einem Lysinrest des Zielproteins gebunden. Da Ubiquitin durch Lysin⁴⁸ auch als Zielprotein fungieren kann, ermöglicht es die Bindung weiterer Ubiquitin-Moleküle und somit die Bildung von Polyubiquitinketten (Pickart, 1997). Die Ubiquitinylierung dient vorrangig als Signal für den Abbau verschiedener Zielproteine über das 26S Proteasom (Rechsteiner, 1987; Bonifacino und Weissman, 1998; Hershko und Ciechanover, 1998).

Am Aminoterminal von E4ORF3 (Abb.C.3) befindet sich eine putative SUMO-1 Konjugationsstelle Ψ KXE; Ψ steht für eine hydrophobe Aminosäure (Puntervoll *et al.*, 2003; Seeler und Dejean, 2003; Xu *et al.*, 2004). Eine solche Konjugationsstelle wird auch für die Ubiquitin-ähnlichen Faktoren SUMO-2 und SUMO-3 und einer Vielzahl weiterer zellulärer Proteine (RanGAP1, p53, PML) beschrieben (zur Übersicht: Melchior, 2000). Die Konjugation von SUMO-1 an zelluläre Faktoren spielt bei vielen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle, wie beispielsweise bei nukleozytoplasmatischen Transportvorgängen, Zellzykluskontrolle, Onkogenese und Abwehr von Virusinfektionen (Saitoh *et al.*, 1997; Hodges *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 1998). Im Wesentlichen scheint die Konjugation von SUMO-1 die Ubiquitinylierung zu verhindern (Desterro *et al.*, 1998), die Protein-Protein-Wechselwirkungen zellulärer Komponenten zu beeinflussen sowie die subzelluläre Lokalisation der so

modifizierten Proteine zu verändern (Mahajan *et al.*, 1998; Matunis *et al.*, 1998; Muller *et al.*, 1998).

RanGAP1	519-HMGLLKSEDKV-529
p53	318-KKLMFKTEGPD-391
I κ B α	16-PRDGLKKERLL-26
PML	485-PRKVIKMESEE-495
SUMO-2	6-PKEGVKTENND-16
SUMO-3	6-PKEGVKTEN-D-15
Ad5 E1B-55kDa	99-GLKGVKREERGA-109
Ad5 E4ORF3	3-RCLRLKVEGAL-13
Konsensus-Sequenz	Ψ KXE

Abb.C.3: Vergleich der Aminosäuresequenz von verschiedenen zellulären und viralen Proteinen mit der Konsensus-Sequenz des SUMO-1 Konjugationsmotivs Ψ KXE

Zur Klärung der Fragestellung, ob es sich bei E4ORF3 um ein virales, Ubiquitin-ähnliches Protein handelt, wurden Mutationsanalysen durchgeführt. Durch die Mutation GG97/98AA wurde das GG-Motiv zerstört, eine gezielte proteolytische Spaltung durch Hydrolasen verhindert und dadurch die mögliche Konjugation an anderen Proteinen unterbunden. Die Einführung eines Stopp-Kodons im direkten Anschluss an GG-Motiv (GG/Stopp) stellt hingegen ein prozessiertes E4ORF3-Protein dar, das – ähnlich wie SUMO-1 GG/Stopp – zumindest *in vitro* wesentlich effizienter an die Zielproteine kovalent gebunden werden sollte. Der Austausch des Lysins (K8R) innerhalb der Ad E4ORF3-Sequenz zerstört zudem das putative Konjugationsmotiv am Aminoterminus und verhindert sowohl eine mögliche Modifizierung von E4ORF3 durch Ubiquitin oder anderen Ubiquitin-ähnlichen Proteinen als auch die Konjugation mit weiteren E4ORF3-Molekülen. Zusätzlich inhibiert die Mutation am Lysin⁸, das einzige Lysin in der gesamten Ad5 E4ORF3-Sequenz, eine weitere mögliche posttranslationale Modifizierung, nämlich die reversible N^ε-Lysin-Azetylierung durch Histonazetyltransferasen (HAT), wie p300/CBP oder P/CAF.

In unserer Arbeitsgruppe lagen bereits einige der zu untersuchenden E4ORF3-Varianten vor. Zu ihnen zählen die E4ORF3-Mutanten K8R, L13A, Y40A, GG97/98AA, GG/Stopp, T96A, L103A und L111A. Zusätzlich wurden während dieser Arbeit die Mutanten NES, EE52/53AA, N82A, L106A sowie L115A hergestellt.

C.2 Konstruktion von E4ORF3-Varianten

Die Einführung von Mutationen in das E4ORF3-Polypeptid erfolgte mit Hilfe des *Quick-Change™ Site-Directed Mutagenesis* Systems der Firma STRATAGENE (Amsterdam, Niederlande) unter Verwendung der unter B.4.2 aufgeführten Oligonukleotide. Als Matrize diente die Wildtyp-Gensequenz von Ad5 E4ORF3, die in den Expressionsvektor pcDNA3 der Firma INVITROGEN eingefügt wurde. Bei allen Mutationen fand ein Aminosäureaustausch gegen Alanin statt, um eine sterische Hinderung durch die ersetzte Aminosäure möglichst zu verhindern. Einzige Ausnahme bildete dabei die Variante K8R, die einen konservativen Austausch gegen Arginin aufweist.

C.3 Expression von E4ORF3-Varianten

Der Einfluss der verschiedenen Mutationen auf die Gleichgewichtsmengen der E4ORF3-Varianten wurde zunächst in H1299-Zellen mit Hilfe der *Western Blot*-Analyse überprüft (Abb.C.4).

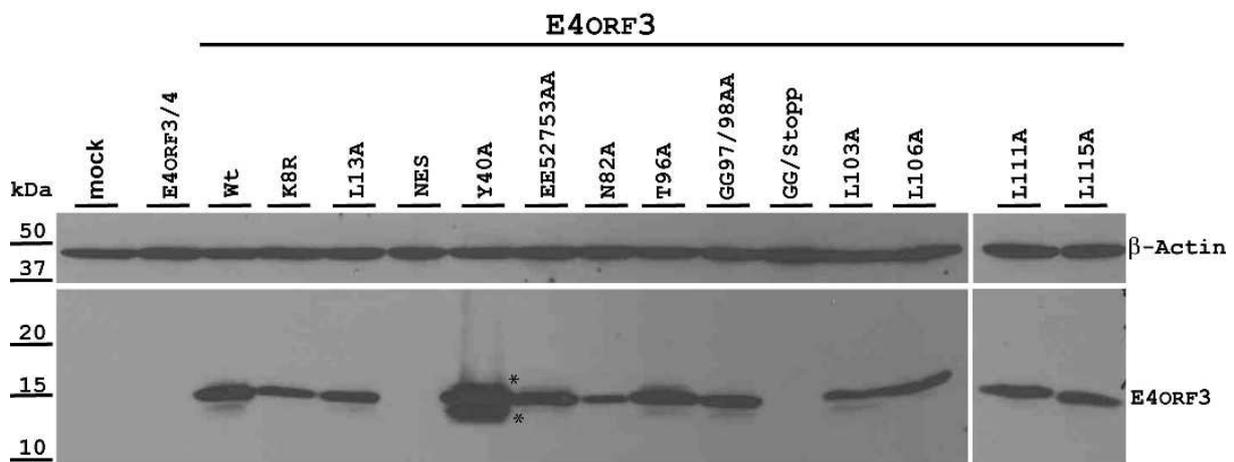


Abb.C.4: Western Blot-Analyse der transienten Expression von E4ORF3-Proteinen in H1299

3×10^5 H1299-Zellen wurden mit $5 \mu\text{g}$ der E4ORF3-Expressionsplasmide mittels CaHPO_4 -Präzipitation transfiziert. Als Negativkontrolle dienten pcDNA3-transfizierte H1299-Zellen (mock). Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion geerntet. Nach Auftrennung von $300 \mu\text{g}$ Gesamtprotein über ein denaturierendes 15%-iges SDS-Polyacrylamidgel wurde das E4ORF3-Polypeptid mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 6A11 aus der Ratte im Immunoblot detektiert. Der Nachweis von β -Actin erfolgte mit dem monoklonalen β -Actin-Antikörper aus Maus (SIGMA, München) und diente als Ladekontrolle. Der Molekulargewichtsstandard ist links angezeigt; die entsprechenden Proteine sind rechts gekennzeichnet. Die zusätzlichen Migrationsformen von E4ORF3 sind exemplarisch mit einem Sternchen (*) markiert.

Die überwiegende Mehrheit der Ad5 E4ORF3-Mutanten zeigte keine nennenswerten Unterschiede zum E4ORF3 Wt-Protein hinsichtlich ihrer Gleichgewichtsmengen. Lediglich die Mutanten NES und GG/Stopp zeigen kaum nachweisbare E4ORF3-Mengen. Mutationen an carboxyterminalen Leucinresten resultieren zudem in veränderten, langsameren Laufgeschwindigkeiten der jeweiligen E4ORF3-Polypeptide (L103A, L106A, L111A, L115A).

Darüber hinaus können bei fast allen E4ORF3-Proteinen zusätzlich langsamere und/oder schnellere Migrationsformen festgestellt werden. Diese Formen sind exemplarisch für die E4ORF3-Expressionsvariante Y40A dargestellt und in Abb.C.4 mit Sternchen (*) markiert. Insbesondere bei der Mutante Y40A sind diese zusätzlichen Migrationsformen im Vergleich zum Wildtyp-Protein deutlich erkennbar, da Y40A insgesamt wesentlich höhere Gleichgewichtsmenge aufweist. Die Deletion, die laut NetPhos 2,0 die einzig wahrscheinliche Phosphorylierungsstelle (Y40) im gesamten E4ORF3-Protein zerstört, führt dabei nicht zum Verschwinden von einer dieser markierten Proteinbanden.

C.4 Phosphorylierung von Ad5 E4ORF3 *in vivo*

Die im *Western Blot* beobachteten, verschiedenen Migrationsformen des E4ORF3-Proteins, das in der Literatur als 11 bzw. 14kDa-Protein beschrieben wird (Lassam *et al.*, 1979; Downey *et al.*, 1983), deuten daraufhin, dass E4ORF3 selbst gewissen Modifizierungen unterzogen wird. Da E4ORF3 über einige, zum Teil hoch konservierte, Serin-, Threonin- und Tyrosinreste verfügt, sollte zunächst überprüft werden, ob diese Aminosäuren phosphoryliert werden. Mit Hilfe der Programme NetPhos 2, 0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>, Blom *et al.*, 1999) und NetPhosK 1,0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK>, Sicheritz-Ponten, *et al.*, in Vorbereitung) war es möglich, sowohl putative Phosphorylierungsstellen innerhalb von E4ORF3 als auch potenzielle E4ORF3-spezifische Proteinkinasen zu identifizieren (Abb.C.5). Den theoretischen Betrachtungen zu Folge ist die zelluläre DNA-abhängige Protein-Kinase (DNA PK) imstande, E4ORF3 an Serin⁸⁷ zu phosphorylieren. Interessanterweise konnten Ketner und Kollegen zeigen, dass Ad5 E4ORF3 an die katalytische Untereinheit von DNA PK bindet (Boyer *et al.*, 1999). Diese Kinase erfüllt eine wichtige Funktion bei der End-zu-End-Verknüpfung im Zuge der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (zur Übersicht: Smith und Jackson, 1999). Die Wechselwirkung von E4ORF3 mit DNA PK blockiert dabei möglicherweise die Entstehung konkatemerer viraler Genome in lytisch

infizierten Zellen (Weiden und Ginsberg, 1994; Boyer *et al.*, 1999; Nicolas *et al.*, 2000). Aufgrund dieser direkten Interaktion mit DNA PK könnte E4ORF3 nicht nur die Funktion von DNA PK beeinflussen, sondern auch gleichzeitig als Substrat dieses zellulären Faktors an Serin⁸⁷ phosphoryliert werden.

Position	Proteinkinase	Treffer
Serin ⁶⁰	cdc2	0,52
Serin ⁸⁷	DNA PK	0,53
Threonin ⁹⁶	CKII	0,52

Abb.C.5: Potenziell phosphorylierte Aminosäurereste in E4ORF3 mit Angabe der jeweils wahrscheinlichen Protein-Kinase

Die Vorhersage erfolgte mit Hilfe des Programms NetPhosK 1,0. Der untere Schwellenwert liegt bei 0,5. cdc2: Cyclin-abhängige Protein-Kinase; DNA PK: DNA-abhängige Protein-Kinase; CKII: Casein-Kinase II.

Aufgrund dieser Informationen wurde daher überprüft, ob das E4ORF3-Protein generell durch Phosphorylierung modifiziert wird (Abb.C.6).

Hierzu wurden zunächst das E4ORF3-Wildtyp-Protein und die Mutante L103A transient in BRK1-Zellen exprimiert. Nach Immunpräzipitation von E4ORF3 und Behandlung der Präzipitate mit λ -Phosphatase in Anwesenheit oder in Abwesenheit der Phosphatase-Inhibitoren EDTA und Natriumfluorid erfolgte der Nachweis von nicht phosphorylierten und phosphorylierten E4ORF3-Formen. Dies geschah nach Auftrennung des präzipitierten E4ORF3-Proteins mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließender *Western Blot*-Analyse mit Hilfe des E4ORF3-spezifischen Antikörpers 6A11.

Die Behandlung des Wildtyp-Proteins und der Mutante L103A mit λ -Phosphatase, die spezifisch gegen phosphorylierte Serin-, Threonin- und Tyrosinreste wirkt (Zhuo *et al.*, 1993), resultiert in jeweils zwei verschiedenen Migrationsformen des jeweiligen E4ORF3-Proteins. Analog zu den Expressionsexperimenten können auch hier veränderte und langsamere Laufeigenschaften des E4ORF3 L103A-Proteins gegenüber dem E4ORF3 Wt beobachtet werden (Abb.C.4). Nach Zugabe von Phosphatase-Inhibitoren, welche die Aktivität der λ -Phosphatase nahezu vollständig blockieren (EDTA: ~95%, NaF: ~90%), wird eine weitere, langsamere Migrationsform von E4ORF3 mit einem Molekulargewicht von etwa 15kDa sichtbar. Diese Form, die in Abb.C.6 mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet ist, entspricht somit dem phosphoryliertem E4ORF3. Sie ist auch bei den beiden Varianten Y40A und T96A, die aufgrund von Aminosäureaustausche an Tyrosin⁴⁰ bzw Threonin⁹⁶ nicht mit Phosphatresten

modifiziert werden können, nach transienter Transfektion in H1299-Zellen erkennbar (Abb.C.4). E4ORF3 L103A wird im Gegensatz zum Wildtyp-Protein nicht dieser posttranslationalen Modifizierung unterzogen, obwohl L103A über die gleichen möglichen Phosphorylierungsstellen verfügt wie das Wildtyp-Protein. Dies deutet daraufhin, dass die veränderte nukleäre Lokalisation der L103A-Variante (Abb.C.7) die Modifizierung mit Phosphatresten verhindert.

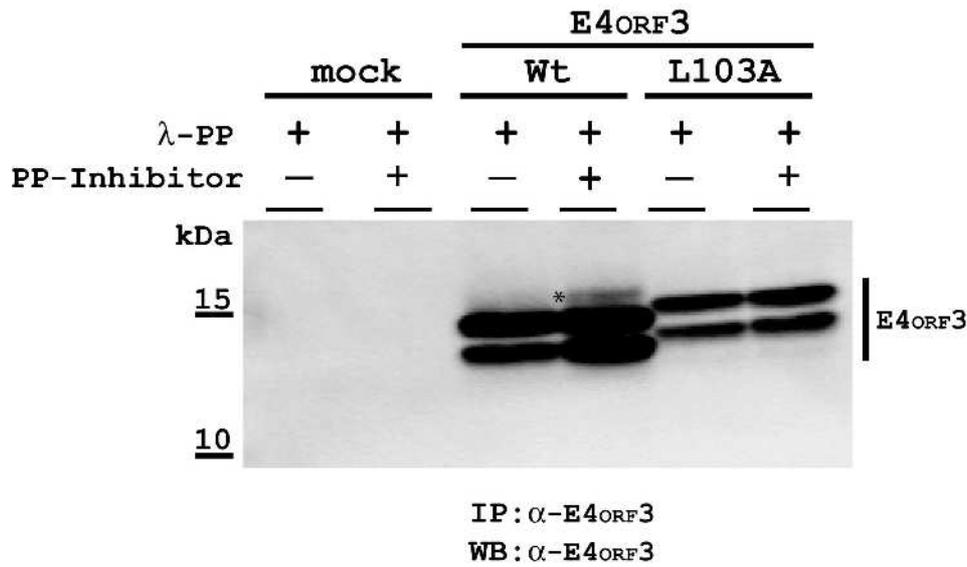


Abb.C.6: Immunpräzipitation und Phosphatase-Behandlung von Ad5 E4ORF3 in BRK1-Zellen

1×10^6 BRK1-Zellen wurden mit je 4 μ g der E4ORF3-Expressionsplasmide (pcDNA-HA) nach der Liposomen-Methode (Lipofectamine™ 2000; INVITROGEN, Karlsruhe) transfiziert. Als Negativkontrolle dienten pcDNA3-transfizierte BRK1-Zellen (mock). Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion geerntet. Die Immunpräzipitation von 1 mg Gesamtprotein erfolgte mit dem E4ORF3-spezifischen Antikörper 6A11. Zur Abspaltung von Phosphatgruppen wurde präzipitiertes E4ORF3 mit 400 U λ -Phosphatase (λ -PP) und 2mM $MnCl_2$ für 30 min bei 30°C behandelt. Dies geschah entweder in Abwesenheit (-) oder in Anwesenheit (+) von Phosphatase-Inhibitoren (50 mM EDTA, 50 mM NaF). Nach Auftrennung des Präzipitats über ein denaturierendes 15%-iges SDS-Polyacrylamidgel wurde das E4ORF3-Polypeptid mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 6A11 im *Western Blot* detektiert. E4ORF3 ist rechts gekennzeichnet. Phosphoryliertes E4ORF3 ist mit einem Sternchen (*) markiert. WB: *Western Blot*; IP: Immunpräzipitation.

Zusammengefasst zeigt dieses Ergebnis, dass (i) E4ORF3 phosphoryliert wird, dass (ii) es innerhalb der E4ORF3-Aminosäuresequenz neben Tyrosin⁴⁰ bzw Threonin⁹⁶ noch weitere potenzielle Phosphorylierungsstellen (z.B. Serin⁸⁷) gibt, die stattdessen oder zusätzlich – möglicherweise über zeitlich regulierte Vorgänge – Verwendung finden und dass (iii) E4ORF3-spezifische Strukturen oder vermutlich bestimmte Protein-Protein-Wechselwirkungen im Zellkern eine notwendige Voraussetzung für die Phosphorylierung von E4ORF3 bilden.

C.5 Lokalisation von E4ORF3-Varianten in H1299-Zellen

Aufgrund der Tatsache, dass E4ORF3 in der Lage ist, charakteristische elongierte Strukturen im Zellkern auszubilden, sollte untersucht werden, welchen Einfluss die eingeführten Mutationen auf die Lokalisation von E4ORF3 innerhalb der Zelle haben. Zu diesem Zweck wurden Immunfluoreszenz-Analysen in H1299-Zellen durchgeführt (Abb.C.7).

Das Ergebnis zeigt, dass das Wildtyp-Protein und ein Großteil der untersuchten E4ORF3-Varianten sehr heterogene Strukturen im Zellkern ausbilden. Stark vereinfacht lassen sich diese in (i) punktförmige, (ii) kurze, stäbchenförmige und (iii) komplexe, fadenartige Strukturen im Zellkern unterteilen.

Ein weiteres wichtiges Unterscheidungsmerkmal bilden die Strukturen im Zytoplasma. Diese werden als *perinuclear bodies* (PNBs) oder neuerdings als Aggresomen (Araujo *et al.*, 2005) bezeichnet (Abb.C.7A: Bild a), wenn sie kreisrund sind und direkt am Zellkernrand liegen. Handelt es sich aber um mehrere und vielgestaltige E4ORF3-Strukturen, die nur lose mit dem Zellkern assoziiert sind, werden sie als zytoplasmatische Aggregate beschrieben (Abb.C.7A: Bild e).

Da die größten Unterschiede zwischen den E4ORF3-Mutanten bei der Ausbildung der komplexen Strukturen bestehen, werden diese zur Charakterisierung der verschiedenen E4ORF3-Polypeptide herangezogen. Diejenigen Mutanten jedoch, die dagegen ein sehr homogenes Verteilungsmuster aufweisen (N82A, GG/Stopp, L103A und L13A, L111A sowie T96A), werden anhand ihrer vorherrschenden Strukturen eingeteilt.

Sowohl das Wildtyp-Protein als auch die Variante K8R weisen die komplexen und elongierten Strukturen auf, die sich stark verzweigen und bis auf den Nukleolus den gesamten Zellkern auskleiden (Abb.C.7A: Bild a und b). Darüber hinaus befindet sich in 30 bis 50% dieser Zellen E4ORF3 auch am Rande des Zellkerns als eine große, kreisförmige Struktur (PNB). Anders dagegen sieht es bei den E4ORF3-Mutanten GG97/98AA, L106A und L115A aus (Abb.C.7B: Bild b, e und g), denn hier kann man nur in wenigen Zellen diese kreisrunden PNB-Strukturen erkennen (<5%). Während L106A ähnliche Strukturen im Zellkern ausbildet wie das Wildtyp-Protein, zeigen sowohl GG97/98AA und L115A bevorzugt punktförmige oder spindelartige Strukturen im Zellkern.

Anders als bei den oben genannten E4ORF3-Varianten findet man sowohl das NES-Protein als auch die Mutante T96A überhaupt nicht im Zytoplasma; weder als PNBs noch als zytoplasmatische Aggregate (Abb.C.7A: Bild d). Interessanterweise führt die Inaktivierung des putativen Exportsignals (NES) ebenso wie die Mutation T96A (Abb.C.7B: Bild a) zur

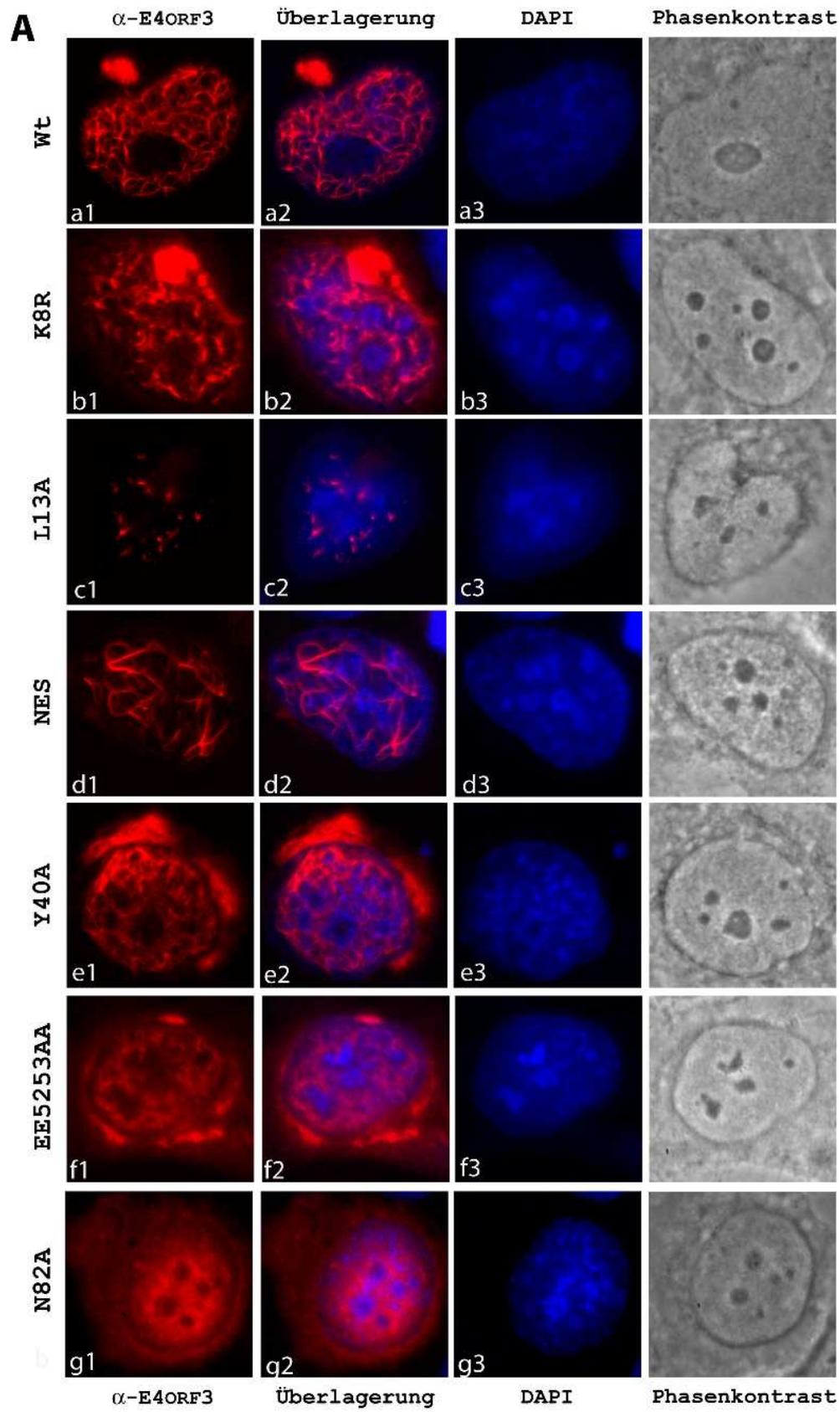
Ausbildung sehr langer und filigraner, fadenartiger Strukturen. Die Tatsache, dass die NES-Mutante zudem auch keinerlei zytoplasmatische Aggregate mehr ausbilden kann, legt die Vermutung nahe, dass die fehlende Exportfunktion zur Akkumulation von E4ORF3 in Form von sehr langen Strukturen führen könnte.

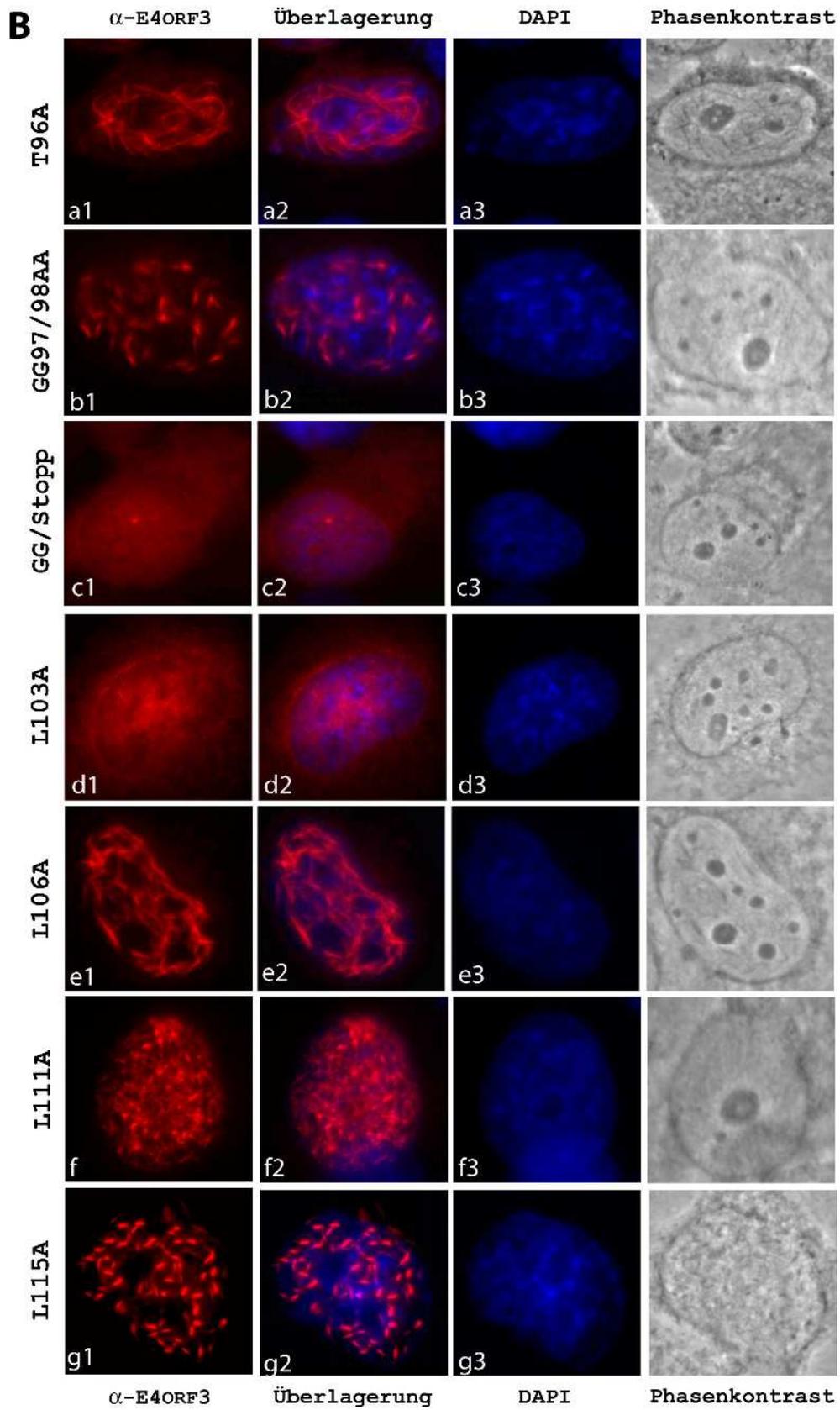
Die beiden Mutationen im zentralen Bereich des E4ORF3-Proteins (Y40A, EE52/53AA) haben zwar keinen wesentlichen Einfluss auf die nukleäre Verteilung von E4ORF3, führen aber in den meisten Fällen (>70%) zur Ausbildung charakteristischer, ringförmiger zytoplasmatischer Aggregate, die den Zellkern teilweise oder sogar ganz umgeben können (Abb.C.7A: Bild d und f).

Neben den E4ORF3-Varianten, die sehr komplexe Strukturen im Zellkern ausbilden, lassen sich die restlichen E4ORF3-Proteine in zwei weitere Gruppen einteilen. So zeichnen sich die Mutanten L13A (Abb.C.7A: Bild c) und L111A (Abb.C.7B: Bild f) vor allem durch die Ausbildung punkt- bzw. stäbchenförmiger Strukturen im Zellkern aus. Demgegenüber zeigen E4ORF3 N82A (Abb.C.7A: Bild g), GG/Stopp und L103A (Abb.C.7B: Bild c und d) neben punktförmigen Strukturen im Zellkern eine überwiegend diffuse Verteilung. Während die beiden Mutanten N82A, GG/Stopp nur im Zellkern vorkommen, kann bei L103A eine gleichmäßige Anfärbung des Zellkerns und des Zytoplasmas beobachtet werden. Darüber hinaus bilden alle Mitglieder dieser beiden Gruppen weder PNBs noch zytoplasmatische Strukturen aus.

Abb.C.7 (siehe S. 71 ff): Immunfluoreszenzanalysen von Ad5 E4ORF3-Polypeptiden in H1299

3×10^5 H1299-Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät und bei einer Konfluenz von 60 bis 80% mit 5 µg der E4ORF3-Expressionsplasmide mittels CaHPO_4 -Präzipitation transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mittels Methanol fixiert. (A und B) Der Nachweis des E4ORF3-Proteins erfolgte schließlich mit dem E4ORF3-spezifischen Antikörper 6A11 (a1 bis g1) und einem entsprechenden TR-gekoppelten, sekundären Antikörper. Zum besseren Erkennen des Zellkerns wurde die DNA mit DAPI angefärbt (a3 bis g3). Die Überlagerung der E4ORF3- und der DAPI-Färbung ist in den Bildern a2 bis g2 dargestellt. Alle Aufnahmen wurden mit 1.000-facher Vergrößerung aufgenommen.





Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Versuche (Abb.C.7), dass Mutationen innerhalb der E4ORF3-Aminosäuresequenz vor allem Auswirkungen auf die Ausbildung bestimmter nukleärer und/oder zytoplasmatischer Strukturen, aber auch auf die Lokalisation des E4ORF3-Proteins innerhalb der Zelle haben. Genauer betrachtet ergeben die Analysen, dass (i) E4ORF3 Wt in transfizierten Zellen so genannte PNB-Strukturen bildet, dass (ii) durch Mutationen im zentralen Bereich (Y40A, EE52/53AA) in der Hauptsache ringförmige zytoplasmatische Aggregate entstehen, dass (iii) die meisten Mutationen mit einer deutlichen Reduktion der PNB-Strukturen einhergehen; einzige Ausnahme bildet dabei die Mutante K8R, dass (iv) neben L103A auch die Varianten N82A und GG/Stopp eine diffuse Verteilung von E4ORF3 bewirken und dass schließlich (v) die Inaktivierung der putativen NES-Sequenz zum Verschwinden zytoplasmatischer E4ORF3-Formen und zur Ausbildung langer filigraner Strukturen im Zellkern führt.

Einteilung	E4ORF3-Protein	E4ORF3-Strukturen	
		im Zellkern	im Zytoplasma
Komplexe Strukturen	Wt, K8R	fadenartig	PNB: 30 bis 50% der Zellen
	Y40A, EE52/53AA	fadenartig	ringförmige zytoplasmatische Aggregate
	L106A	fadenartig	PNB: <5% der Zellen
	GG97/98AA, L115A	punktförmig und spindelartig	PNB: <5% der Zellen
	NES, T96A	filigran, wollknäuelartig	PNB: <1% der Zellen
Einfache Strukturen	L13A, L111A	punkt- und stäbchenförmig	kein PNB
Diffuse Verteilung	N82A, GG/Stopp	diffus	kein PNB
	L103A	diffus	diffus, kein PNB

Tab.C.1: Tabellarischer Überblick der Immunfluoreszenz-Analyse verschiedener E4ORF3-Varianten in H1299-Zellen. PNB: *perinuclear body*.

C.6 Interaktion von E4ORF3 mit PML NB-Strukturen

Im Kontext der Adenovirusinfektion erfolgt bereits in der frühen Phase der Replikation eine Modulation der PML NBs (Carvalho *et al.*, 1995; Puvion-Dutilleul *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996). Es ist dabei allgemein anerkannt, dass das E4ORF3-Protein allein für diese Reorganisation verantwortlich zeichnet (Carvalho *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996; Ishov und Maul, 1996). Die molekularen Mechanismen die der Umstrukturierung der PML NBs in fadenartige Strukturen durch das virale Protein zu Grunde liegen sind dagegen nach wie vor unklar. So ist die Reorganisation dieser nukleären Strukturen nicht auf eine veränderte SUMOylierung von exogenem PML zurückzuführen (Muller und Dejean, 1999). Darüber hinaus konnte bislang keine direkte Wechselwirkung zwischen E4ORF3 und dem zellulären Tumorsuppressor nachgewiesen werden (Nevels *et al.*, 1999b). Der Einfluss von E4ORF3 scheint daher indirekter Natur zu sein. Demnach gehört E4ORF3 zu der großen Anzahl an Proteinen, die zwar mit PML NBs assoziieren, aber nicht imstande sind, an PML-Proteine zu binden (zur Übersicht: Strudwick und Borden, 2002). Dies deutet darauf hin, dass für die Funktion von E4ORF3 im Viruskontext und in der Transformation wahrscheinlich die Interaktion mit anderen PML NB-Komponenten eine wichtige Rolle spielt. Gerade in Hinblick auf das transformierende Potenzial von E4ORF3 sind vor allem die Faktoren von großem Interesse, die einerseits mit PML NBs assoziieren, andererseits an der Kontrolle des Zellwachstums beteiligt sind und/oder als Tumorsuppressoren fungieren. Zunächst sollten aber im Rahmen dieser Arbeit durch weiterführende Mutationsanalysen weitere Bereiche innerhalb des E4ORF3-Polypeptids identifiziert werden, die grundsätzlich für die Modulation der PML NBs notwendig sind. Frühere Arbeiten konnten bereits zeigen, dass die Assoziation von E4ORF3 mit PML NB-Strukturen unter anderem über das Leucin¹⁰³ im Carboxyterminus des Polypeptids vermittelt wird (Täuber, 2002).

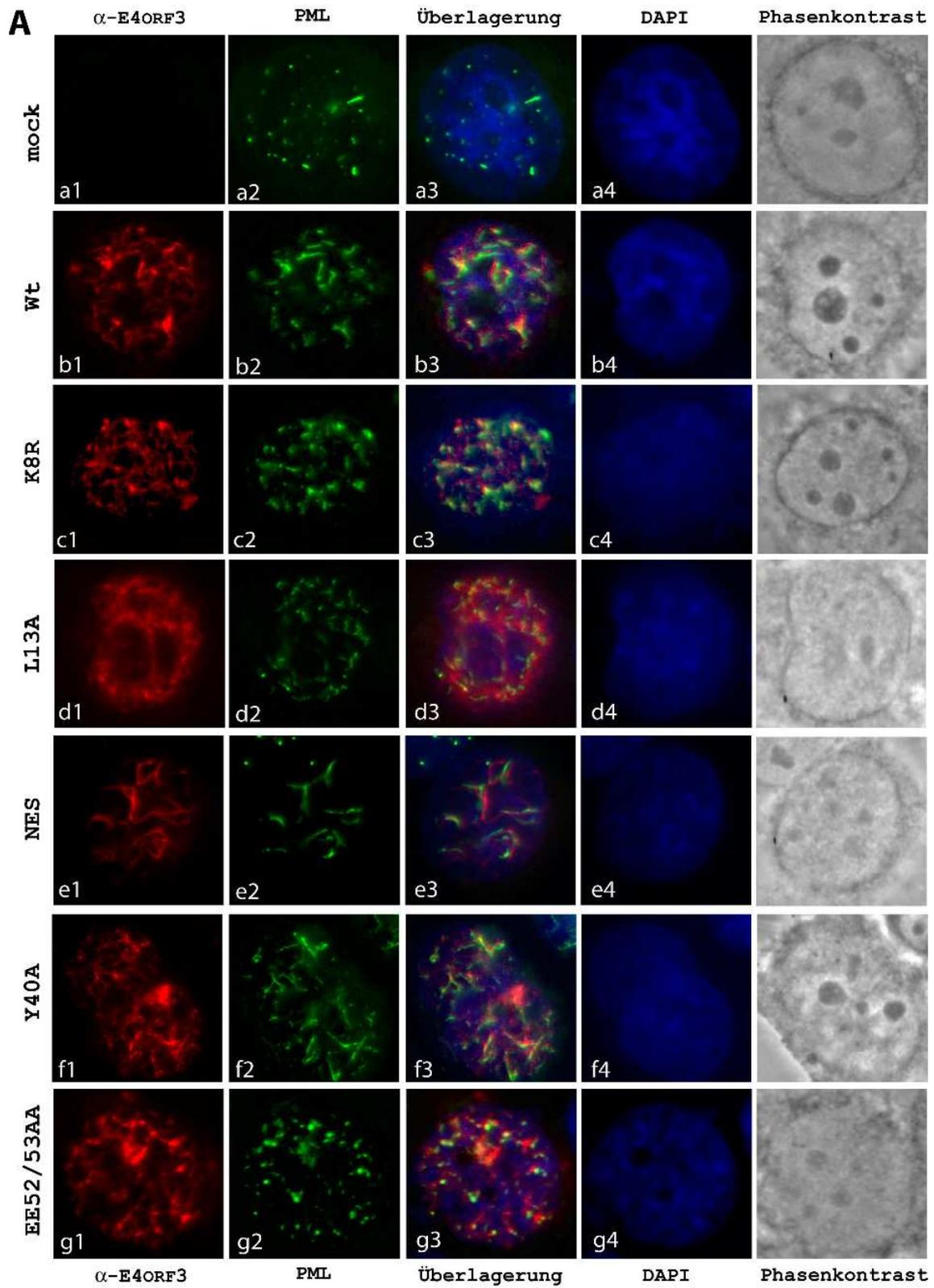
Die entsprechenden Untersuchungen wurden in transient transfizierten Rattennierenzellen durchgeführt, um die daraus gewonnenen Ergebnisse mit denen der nachfolgenden Transformationsversuche vergleichen zu können (Abb.C.8). Die Immunfluoreszenz-Analysen bestätigen frühere Arbeiten, wonach das Wildtyp-Protein in den modulierten PML NB-Strukturen zu finden ist (Täuber, 2002). In 50% der Zellen zeigt sich demzufolge eine Reorganisation der PML NBs. Die Modulation jedoch erfolgt nur dann, wenn E4ORF3 Wt selbst in elongierten Strukturen vorliegt. Andernfalls bleibt die punktförmige Struktur der PML NBs erhalten. Neben dem Wildtyp-Protein besitzen aber auch einige E4ORF3-Varianten die Fähigkeit, die PML NBs zu modulieren und mit diesen Strukturen zu assoziieren. Dazu

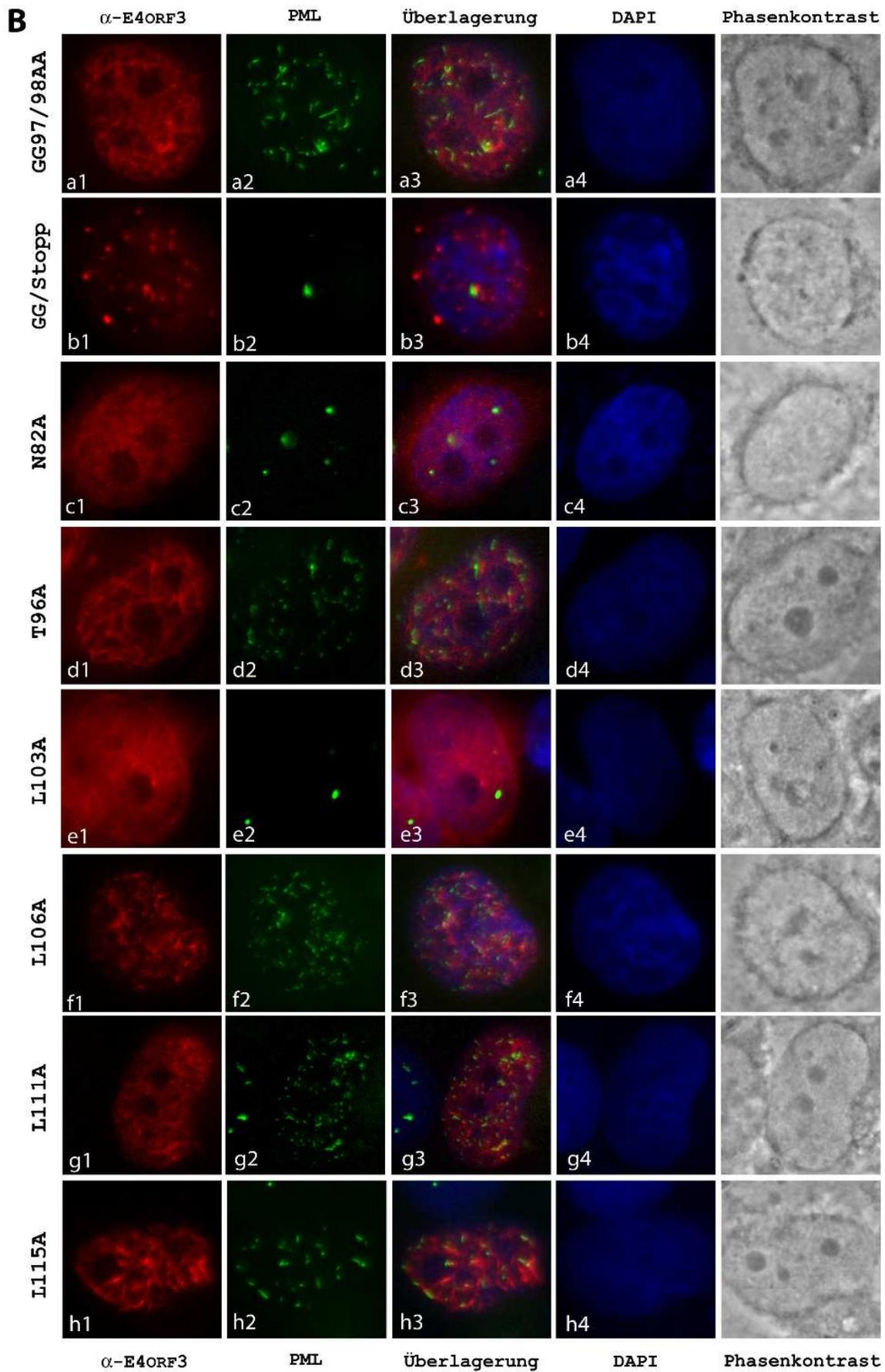
gehören die Mutanten K8R, L13A, NES, Y40A und GG97/98AA (Abb.C.8A: Bild c2, d2, e2 und f2). Demgegenüber steht eine Reihe von anderen E4ORF3-Varianten, die nicht in der Lage sind, die Ausbildung elongierter PML NB-Strukturen zu induzieren (Abb.C.8A: Bild g2, Abb.C.8B: Bild d2, f2, g2 und h2). Dazu zählen die Mutanten EE52/53AA, T96A, L106A, L111A und L115A (T96A und L106A: ~70%; EE52/53AA, L111A und L115A: ~80 bis 90%). Interessanterweise haben diese Mutationen innerhalb der E4ORF3-Region keinen deutlichen Einfluss auf die Ausbildung der E4ORF3-Strukturen und die Kolokalisation des E4-Proteins mit PML NBs. Eine nennenswerte Veränderung der Größe und der Anzahl dieser nukleären Strukturen ist dabei nicht zu beobachten.

Im Gegensatz dazu induziert die Deletion des Carboxyterminus von E4ORF3 möglicherweise die Fusion der NBs im Zellkern (Abb.C.8B: Bild b2). Denn nach transienter Expression von GG/Stopp ist die Anzahl der punktförmigen PML NBs von durchschnittlich zehn auf eins bis fünf pro Zelle reduziert worden. Der Durchmesser dieser punktförmigen Strukturen hat sich dagegen deutlich vergrößert. Dennoch ist auch GG/Stopp in der Lage, mit weniger als drei PML NBs pro Zelle zu kolokalisieren. Die Veränderungen der PML NBs hinsichtlich ihres Durchmessers und ihrer Anzahl, die durch diese E4ORF3-Mutanten ausgelöst werden, könnte dabei ein Zeichen von Zellstress sein. Des Weiteren ergaben die Analysen, dass es neben GG/Stopp noch weitere E4ORF3-Mutanten gibt, die eine diffuse und/oder punktförmige Verteilung im Zellkern aufweisen. Es handelt sich dabei um die Varianten N82A und L103A (Abb.C.8B: Bild c1 und e1). Ähnlich wie bei GG/Stopp verhindern die Mutationen zum einen die Ausbildung dieser E4ORF3-typischen, fadenförmigen Strukturen. Zum anderen blockieren diese Aminosäureaustausche die Reorganisation der PML NBs in elongierte Strukturen (Abb.C.8B: Bild c2 und e2). Doch im Gegensatz zu GG/Stopp ist keine der beiden Mutanten dazu imstande, mit den ebenfalls vergrößerten und punktförmigen PML NBs zu assoziieren.

Abb.C.8 (siehe S. 76 ff): Lokalisation von Ad5 E4ORF3-Polypeptiden und PML in BRK1-Zellen

3×10^5 BRK1-Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät und bei einer Konfluenz von 80 bis 90% mit je $1 \mu\text{g}$ der entsprechenden E4ORF3-Expressionsplasmide mit Hilfe der Liposomen-Methode (Lipofectamine™ 2000; INVITROGEN, Karlsruhe) transfiziert. Als Negativkontrolle dienten pcDNA3-transfizierte BRK1-Zellen (mock). 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mittels Methanol fixiert. (A und B) Der Nachweis des E4ORF3-Proteins erfolgte schließlich mit dem spezifischen E4ORF3-Antikörper 6A11 (a1 bis h1) und dem entsprechenden TR-gekoppelten, sekundären Antikörper. Die Detektion von endogenem PML geschah mit Hilfe des PML-spezifischen Antikörpers 5E10 (a2 bis h2) und dem entsprechenden FITC-gekoppelten, sekundären Antikörper. Zur Hervorhebung des Zellkerns wurde die DNA mit DAPI angefärbt (a4 bis h4). Die Überlagerung der E4ORF3-, PML- und DAPI-Färbung ist in den Bildern a3 bis h3 dargestellt. Alle Aufnahmen zeigen eine 1.000-fach vergrößerte Darstellung.





Zusammengefasst liefern die Immunfluoreszenz-Analysen folgendes Ergebnis (Tab.C.2): (i) eine Kolokalisation zwischen PML und E4ORF3 ist lediglich innerhalb des Zellkerns, nicht aber in den zytoplasmatischen Aggregaten zu beobachten, (ii) die Ausbildung von E4ORF3-spezifischen Strukturen ist notwendig für die Reorganisation von PML NBs in elongierte Strukturen, (iii) neben der bereits bekannten Mutation an Leucin¹⁰³ führen auch der Aminosäureaustausch des Asparagins an Position 82 sowie die Deletion des Carboxyterminus der E4ORF3-Variante GG/Stopp zu einer überwiegend diffusen Verteilung von E4ORF3 innerhalb des Zellkerns und (iv) schließlich scheint in der Hauptsache der Carboxyterminus von E4ORF3 an der Ausbildung elongierter PML NB-Strukturen beteiligt zu sein.

PML	E4ORF3-Protein	E4ORF3-Strukturen	Kolokalisation mit PML NBs
Reorganisation Kolokalisation	Wt	Fadenartige Strukturen im Zellkern, zytoplasmatische Aggregate	Fadenartige und punktförmige Strukturen im Zellkern
	K8R, Y40A,	Fadenartige Strukturen im Zellkern, zytoplasmatische Aggregate	Fadenartige Strukturen im Zellkern
	NES	Fadenartige Strukturen im Zellkern, zytoplasmatische Aggregate (<10%)	Fadenartige Strukturen im Zellkern
	L13A, GG97/98AA	Fadenartige und punktförmige Strukturen im Zellkern	Fadenartige und punktförmige Strukturen im Zellkern
Keine Reorganisation Keine Kolokalisation	EE52/53AA	Fadenartige Strukturen im Zellkern, zytoplasmatische Aggregate	Punktförmige Strukturen im Zellkern
	T96A, L106A, L111A	Fadenartige Strukturen im Zellkern, zytoplasmatische Aggregate (<10%)	Punktförmige Strukturen im Zellkern
	L115A	Spindelförmige und fadenartige Strukturen im Zellkern	Punktförmige Strukturen im Zellkern
	GG/Stopp	Diffus und punktförmig im Zellkern	Punktförmige Strukturen im Zellkern
Keine Reorganisation Keine Kolokalisation	N82A, L103A	Diffus und punktförmig im Zellkern (N82A) bzw. im Zellkern und Zytoplasma (L103A)	

Tab.C.2: Tabellarische Übersicht der E4ORF3-vermittelten Modulation von PML NBs

C.7 PML ist nicht notwendig für die Ausbildung typischer, elongierter E4ORF3-Strukturen

Es ist bekannt, dass E4ORF3 im Zellkern fadenförmige Strukturen ausbildet und alleine für die Modulation der PML NBs verantwortlich ist (Carvalho *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996; Ishov und Maul, 1996). Die Tatsache jedoch, dass E4ORF3 dabei nicht direkt an PML bindet (Nevels *et al.*, 1999b), wirft zunächst die Frage auf, ob die typischen, fadenförmigen Strukturen von E4ORF3 unabhängig von PML und PML NBs entstehen. Denn mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Analysen konnte bereits gezeigt werden, dass zumindest die Reorganisation der PML NBs keine Rolle für die Ausbildung der typischen E4ORF3-Strukturen spielt. Um nun den Einfluss von PML auf die Entstehung von E4ORF3-Strukturen zu untersuchen, wurde in PML^{-/-} Mausembryo-Fibroblasten (MEF)-Zellen das E4ORF3-Wildtyp-Protein transient exprimiert (Abb.C.9).

Mit Hilfe dieses Experimentes konnte bestätigt werden (Abb.C.9), dass E4ORF3 unabhängig von PML NBs und deren Hauptkomponente PML seine fadenartigen Strukturen ausbilden kann (Abb.C.9B: Bild b1 und b2). Das Wildtyp-Protein zeigt in Abwesenheit von PML die gleichen typischen Strukturen im Zellkern wie in Zellen mit PML NBs und PML (Abb.C.9A: Bild b1 und b2). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Ausbildung der E4ORF3-Strukturen als Signal für die Modulation der PML NBs dient. Darüber hinaus scheint PML eine wichtige Funktion bei der Akkumulation von E4ORF3 im Zytoplasma zu übernehmen. Zellen mit endogenem PML nämlich zeigen weitaus mehr E4ORF3 in Form von zytoplasmatischen Aggregaten (Abb.C.9A: Bild b1) als PML^{-/-} MEF, in denen das Vorkommen von E4ORF3 auf dem Zellkern beschränkt ist (Abb.C.9B: Bild b1). Ob dies auf eine Interaktion des E4-Proteins mit PML oder anderen PML NB-assoziierten Faktoren zurückzuführen ist, muss noch geklärt werden. Eine direkte Wechselwirkung zwischen E4ORF3 und PML konnte bislang nicht nachgewiesen werden (Nevels *et al.*, 1999b).

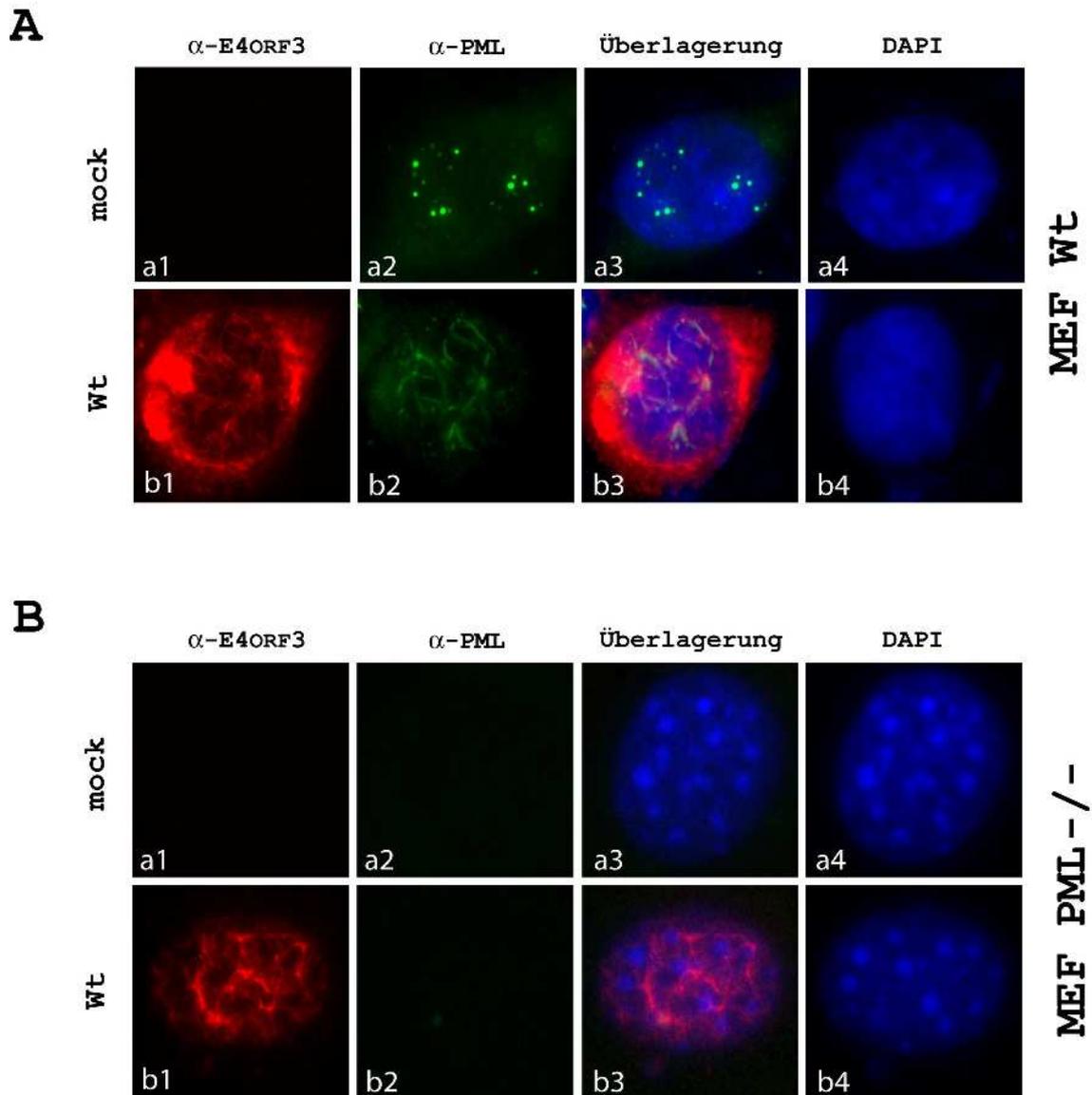


Abb.C.9: PML-unabhängige Ausbildung E4ORF3-typischer Strukturen in PML^{-/-} MEF

Je 1×10^7 PML^{-/-} spontan immortalisierte Mausembryofibroblasten MEF wurden mit je $5 \mu\text{g}$ der E4ORF3-Expressionsplasmide mit Hilfe der Elektroporation (1 Puls, 260 V, $1050 \mu\text{F}$) transfiziert. Als Negativkontrolle dienten pcDNA3-transfizierte MEF-Zellen (mock). Die MEF Wt-Zellen (**A**) und PML^{-/-} MEF-Zellen (**B**) wurden 48 h nach Transfektion mit Methanol fixiert. (**A** und **B**) Der Nachweis des E4ORF3-Proteins erfolgte schließlich mit dem spezifischen E4ORF3-Antikörper 6A11 (a1 und b1) und dem entsprechenden TR-gekoppelten, sekundären Antikörper. Die Detektion von PML geschah mit Hilfe des PML-spezifischen Antikörpers 5E10 (a2 und b2) und dem entsprechenden FITC-gekoppelten, sekundären Antikörper. Zum besseren Erkennen des Zellkerns wurde die DNA mit DAPI angefärbt (a4 und b4). Die Überlagerung der E4ORF3-, PML- und DAPI-Färbung ist in den Bildern a3 und b3 dargestellt. Alle Aufnahmen wurden mit 1.000-facher Vergrößerung aufgenommen.

C.8 E4ORF3 hat keinen Einfluss auf die Gleichgewichtsmengen von verschiedenen PML-Isoformen

In letzter Zeit gibt es vermehrt Hinweise, dass PML und insbesondere PML NBs eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Virusinfektionen spielen. Dies erklärt, warum diese nukleären Strukturen durch Proteine verschiedener Viren moduliert werden. Man vermutet, dass viralen Proteine, die zur Zerstörung der PML NBs (Ahn und Hayward, 1997; Ahn *et al.*, 1998; Wilkinson *et al.*, 1998; Chelbi-Alix und de The, 1999) oder zur Freisetzung von PML NB-Komponenten (Bell *et al.*, 2000) beitragen, auf diese Weise möglicherweise intrazelluläre Abwehrmechanismen blockieren. Die Reorganisation dieser Strukturen durch Ad5 E4ORF3 könnte daher denselben Zweck haben. Ob die E4ORF3-induzierte Modulation dieser PML-Strukturen mit dem Abbau ihrer Hauptkomponente einhergeht, sollte im Folgenden ermittelt werden.

Hierzu wurden in BRK1-Zellen das E4ORF3 Wildtyp-Protein und die Mutante L103A zusammen mit den prominentesten PML-Isoformen PML IV bzw. PML V transient exprimiert (Abb.C.10). Durch die Transfektion von PML-Expressionskonstrukten wurde die Menge an PML deutlich erhöht, da in den meisten Säugerzellen endogenes PML kaum nachweisbar ist. Das Wildtyp-Protein, das im Gegensatz zu L103A in der Lage ist, sowohl die Ausbildung elongierter PML NB-Strukturen zu induzieren als auch mit diesen modulierten Strukturen zu assoziieren, hat keinen Einfluss auf die Gleichgewichtsmengen beider PML-Isoformen. Das gleiche kann auch bei der E4ORF3-Mutante L103A beobachtet werden, bei der aufgrund einer veränderten Lokalisation keine Kolo-kalisation mit PML NBs nachgewiesen werden kann. Das bedeutet, dass die Modulation der PML NBs weder mit einer Zunahme noch mit einer Abnahme an PML-Protein einhergeht.

Das Ergebnis steht im Einklang mit den Resultaten dieser und früherer Arbeiten, die darauf hinweisen, dass die E4ORF3-vermittelte Modulation der PML NBs nicht über die Hauptkomponente PML direkt (Leppard und Everett, 1999; Nevels *et al.*, 1999b), sondern mit Hilfe anderer, PML NB-assoziiierter Faktoren erfolgt.

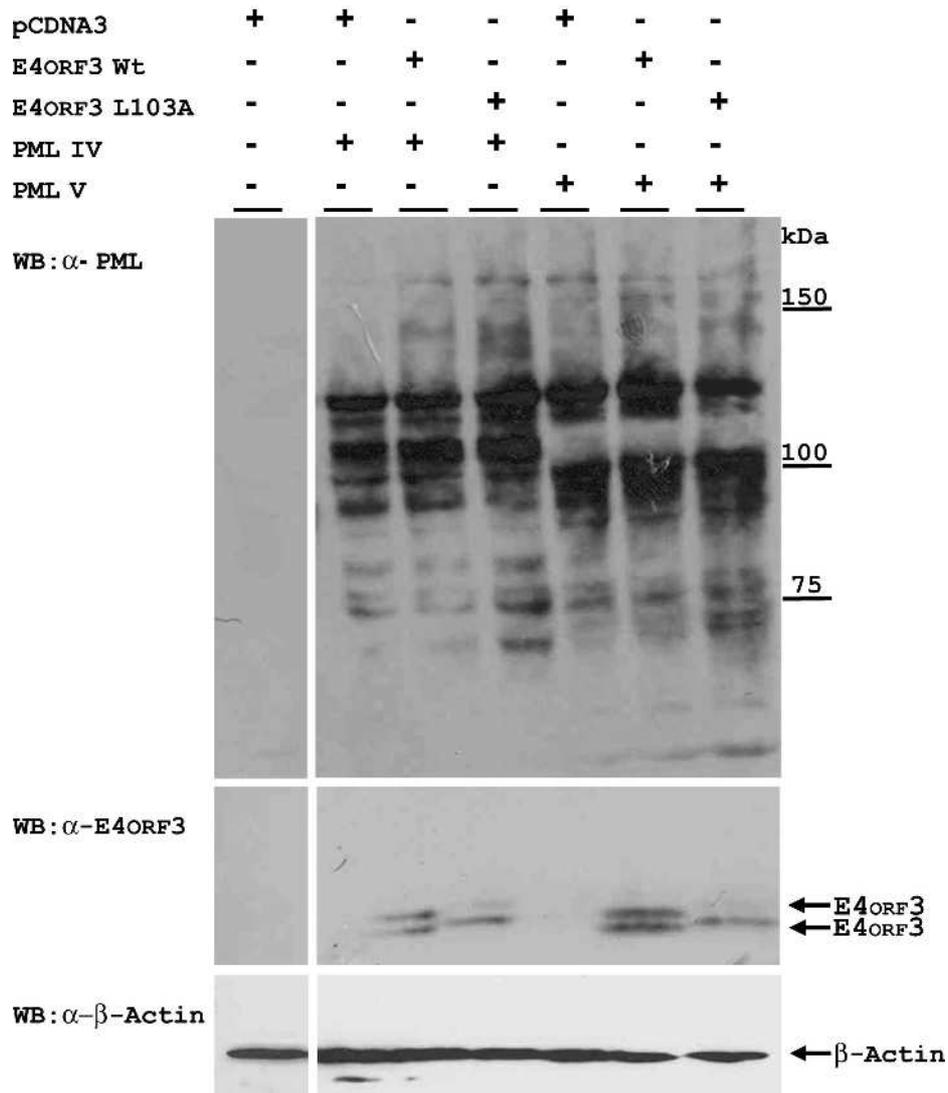


Abb.C.10: Analyse zum Einfluss von E4ORF3 auf die Gleichgewichtsmengen von PML

1×10^6 BRK1-Zellen wurden mit je $4 \mu\text{g}$ der E4ORF3- und PML-Expressionsplasmide (pcDNA-HA) mit Hilfe der Liposomen-Methode (LipofectamineTM 2000; INVITROGEN, Karlsruhe) transfiziert. Als Negativkontrolle dienten pcDNA3-transfizierte BRK1-Zellen (mock). Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion geerntet. Nach Auftrennung von $300 \mu\text{g}$ Gesamtprotein über ein denaturierendes 8%-iges (PML) bzw. 15%-iges (E4ORF3, β -Actin) SDS-Polyacrylamidgel wurde das E4ORF3-Polypeptid mit 6A11-Antikörper, PML mit dem PML-spezifischen Antikörper 5E10 detektiert. Der Nachweis von β -Actin erfolgte mit dem monoklonalen β -Actin-Antikörper (SIGMA, München) und diente als Ladekontrolle. Der Molekulargewichtsstandard bei dem PML-Immunoblot ist rechts angezeigt. Die Pfeile auf der rechten Seite geben das jeweils nachgewiesene Protein an.

C.9 Zusammenfassung (I): E4ORF3 und PML NBs

Die Daten der letzten Jahre belegen, dass E4ORF3 ein breites Funktionsspektrum besitzt, das eine wichtige Voraussetzung für die effiziente Virusreplikation darstellt. Dabei interagiert E4ORF3 mit einer Vielzahl zellulärer Faktoren, die unter anderem an der Transkriptionsregulation, der Apoptose, der Zellzykluskontrolle und der DNA-Reparatur beteiligt sind. Darüber hinaus ist seit langem bekannt, dass im Kontext der Virusinfektion das E4ORF3-Protein allein für die Zerstörung der PML NBs verantwortlich ist (Carvalho *et al.*, 1995; Puvion-Dutilleul *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996). Da nach heutigem Kenntnisstand einige der Funktionen, die von E4ORF3 in der lytischen Infektion ausgeübt werden, auch eine wichtige Rolle bei der Transformation primärer Zellen spielen (zur Übersicht: Täuber und Dobner, 2001b), wird der Modulation der PML NBs durch E4ORF3 eine große Bedeutung bei Transformationsprozessen beigemessen. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit die Interaktion zwischen PML bzw. PML NBs und E4ORF3 untersucht.

Zusammen mit den Ergebnissen früherer Arbeiten unserer Arbeitsgruppe ergibt sich dabei folgendes Bild. Demzufolge

- ist keine direkte Interaktion zwischen E4ORF3 und PML nachweisbar (Nevels *et al.*, 1999b).
- hat E4ORF3 keinen Einfluss auf die Gleichgewichtsmengen der untersuchten dominanten PML-Isoformen IV und V.
- erfolgt die Ausbildung elongierter E4ORF3-Strukturen innerhalb des Zellkerns unabhängig von PML und PML NBs.
- wird die Reorganisation von PML NBs über den Carboxyterminus von E4ORF3 vermittelt.
- erfolgt die Kolokalisation mit PML NBs über Asparagin⁸² und Leucin¹⁰³ von E4ORF3.
- ist die Kolokalisation von E4ORF3 und PML nicht notwendig für das transformierende Potenzial von E4ORF3 (Täuber, 2002).

C.10 Interaktion von E4ORF3 mit PML NB-Komponenten

Nachdem frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe darauf hinwiesen, dass das transformierende Potenzial von E4ORF3 möglicherweise durch Interaktionen mit PML NB-Komponenten vermittelt wird, konzentrierten sich die weiteren Arbeiten auf die Analyse dieser Wechselwirkungen. Dabei waren zunächst Proteine von Interesse, die bekanntermaßen an der Kontrolle des Zellwachstums und der Tumorsuppression beteiligt sind. Als wichtigste Beispiele sind hierbei p53, pRB, PML und CBP/p300 zu nennen.

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass E4ORF3 im Gegensatz zu E1B-55kDa und E4ORF6 keinen Einfluss auf die Gleichgewichtsmengen von p53 hat. Darüber hinaus konnte bislang keine physikalische Interaktion mit dem PML NB-Hauptbestandteil PML nachgewiesen werden (Nevels *et al.*, 1999b). Im Gegensatz dazu konnte in unserer Arbeitsgruppe eine direkte Bindung von Ad5 E4ORF3 an p300 *in vitro* nachgewiesen werden (Täuber, 2002). P300 und dessen Homolog CBP sind Transkriptionskoaktivatoren, die mit einer Vielzahl zellulärer Transkriptionsfaktoren (z.B. p53, NFκB, c-Jun, Fos), nukleären Hormonrezeptoren und Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie interagieren (Abb.C.11).

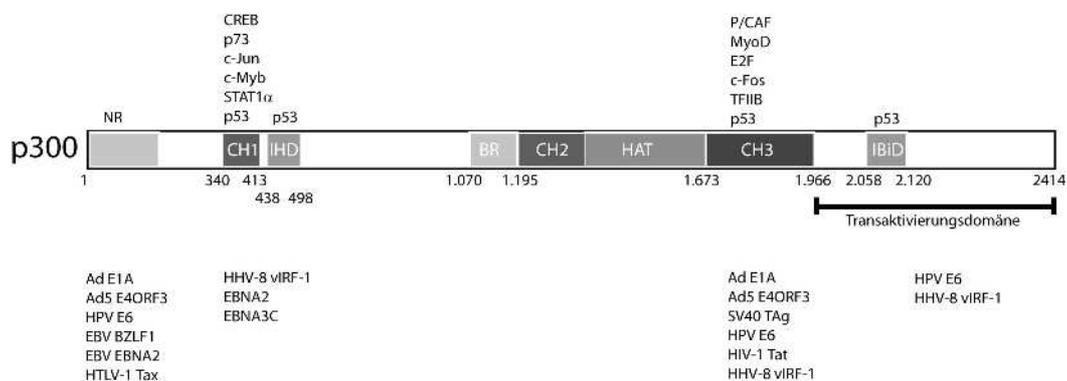


Abb.C.11: Schematische Darstellung der Domänen und Bindungspartner des p300-Proteins

Dargestellt sind die verschiedenen Domänen des humanen p300-Proteins, das mit einer Vielzahl an zellulären, aber auch viralen Faktoren interagiert. Ad5 E4ORF3-Wildtyp-Protein bindet ebenso wie Ad E1A an den Amino-terminus und an die CH3-Domäne von p300. CH1, CH2, CH3: Cystein-Histidin-reiche Zinkfinger-motive; BR: Bromodomäne; HAT: Histonazetyltransferase; NES: nukleäres Exportsignal; NR: nukleärer Hormonrezeptor. Die Zahlen unterhalb des 2414 Aminosäuren umfassenden Proteins geben die Position der Domänen in p300 an.

Zudem besitzen p300/CBP Histonazetyl-transferaseaktivität (HAT) und modulieren die Vorgänge der Transkription vermutlich über Veränderungen der Chromatinstruktur. Ihre wichtige Rolle in der Wachstumskontrolle wird unter anderem durch die Tatsache verdeutlicht, dass beide Proteine tumorsupprimierende Eigenschaften besitzen und prominente Ziele von ver-

schiedenen viralen Onkoproteinen (SV40 TAg, Ad E1A, EBV EBNA2, HTLV-1 Tax) darstellen.

E4ORF3 zeigt auf funktioneller Ebene ähnliche Eigenschaften wie ein anderes frühes adeno-virales Protein. Denn E1A ist ebenso wie E4ORF3 in der Lage, mit den PML NBs zu asso-ziiieren (Carvalho *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996; Ishov und Maul, 1996) und mit CBP/p300 zu interagieren (Subramanian *et al.*, 1989; Whyte *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1993).

C.11 Interaktion von Ad5 E4ORF3-Varianten mit p300

C.11.1 Ad5 E4ORF3-Varianten interagieren mit p300 *in vivo*

In früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte bereits mit Hilfe von Bindungsstudien gezeigt werden, dass das Ad5 E4ORF3-Wildtyp-Protein ebenso wie Ad5 E1A *in vitro* mit dem Aminoterminus und mit verschiedenen Bereichen der carboxyterminalen Transaktivierungs-domäne (CH3) von p300 interagiert. Um nun Interaktionsbereiche seitens des E4ORF3-Proteins festzustellen, wurden Koimmunpräzipitationsversuche mit verschiedenen Ad5 E4ORF3-Varianten und p300 durchgeführt (Abb.C.12 und Abb.C.13).

Der Nachweis der E4ORF3- und p300-Proteine erfolgte zunächst mit Hilfe von *Western Blot*-Analysen (Abb.C.12A und Abb.C.13A). Das Ergebnis zeigt, dass die Expression der ver-schiedenen Ad5 E4ORF3-Varianten in BRK1 mit den in H1299-Zellen beobachteten Gleich-gewichtsmengen vergleichbar sind (Abb.C.4). So weisen auch hier die Mutanten E4ORF3 NES und GG/Stopp eine stark verringerte Gleichgewichtsmenge auf (Abb.C.12A: Spur 6 und 10). Im Falle der Variante NES liegt dies jedoch daran, dass der Nachweis mit Hilfe des E4ORF3-spezifischen Antikörpers 6A11 erfolgt ist, der aufgrund der Aminosäureaustausche am Aminoterminus nur schwach und ineffizient E4ORF3 NES bindet. Denn die Verwendung des HA-spezifischen Antiköpers 3F10 zeigt, dass E4ORF3 NES in ausreichendem Maße exprimiert wird (Abb.C.13A: Spur 8, Rechteck).

Die Bindungsanalyse von p300 an verschiedene E4ORF3-Polypeptide mit Hilfe der Koimmun-präzipitation liefert folgendes Ergebnis (Abb.C.12B und Abb.C.13B). So bindet das Wildtyp-Protein – wie bereits in In-vitro-Bindungsstudien belegt – auch *in vivo* an p300 (Abb.C.12B: Spur 3, Abb.C.13B: Spur 2).

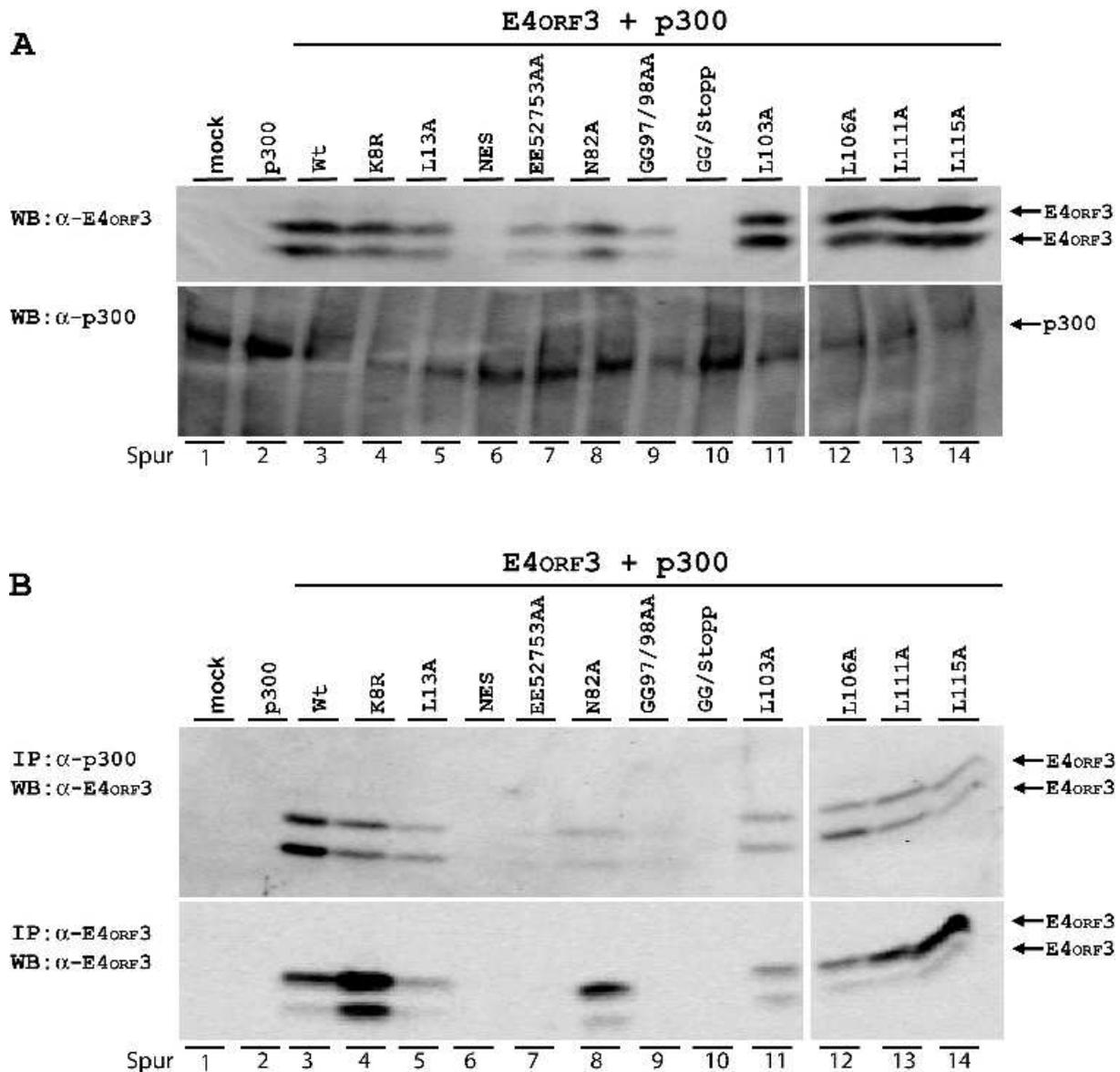


Abb.C.12: Koimmunpräzipitationsanalyse von Ad5 E4ORF3-Proteinen mit p300 in BRK1-Zellen

1 x 10⁶ Zellen wurden mit je 4 µg der E4ORF3- und p300-Expressionsplasmide mit Hilfe der Liposomen-Methode (Lipofectamine™ 2000; INVITROGEN, Karlsruhe) transfiziert. Als Negativkontrolle dienten pcDNA3-transfizierte BRK1-Zellen (mock). Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion geerntet. **(A)** Nach Auftrennung von 300 µg Gesamtprotein über ein denaturierendes 8%-iges (p300) bzw. 15%-iges (E4ORF3) SDS-Polyacrylamidgel wurde p300 mittels des polyklonalen Antikörpers (C20) (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Heidelberg) und das E4ORF3-Polypeptid mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 6A11 im Immunoblot detektiert. **(B)** Die Immunpräzipitation von 1 mg Gesamtprotein erfolgte mit dem p300-spezifischen Antikörper C20 und dem E4ORF3-spezifischen Antikörper 6A11. Nach Auftrennung des Präzipitats über ein denaturierendes 15%-iges SDS-Polyacrylamidgel wurde das E4ORF3-Polypeptid mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 6A11 im Immunoblot detektiert. Das jeweils nachgewiesene Protein ist rechts mit einem Pfeil gekennzeichnet. WB: Western Blot; IP: Immunpräzipitation.

Darüber hinaus haben Mutationen sowohl in der zentralen Region als auch am Carboxyterminus des Ad5 E4ORF3-Proteins keinen Einfluss auf die Interaktion mit p300 (Abb.C.12B: Spuren 7 bis 9 und 11 bis 14). Lediglich die Mutationen am Aminoterminus (NES) führen zu

einer fast vollständigen Aufhebung der Bindung zwischen dem viralen Protein und p300 (Abb.C.13B: Spur 8, Rechteck). Dies kann mit Hilfe von Koimmunpräzitationsanalysen gezeigt werden. Denn das E4ORF3 NES-Protein ist mit dem HA-spezifischen Antikörper 3F10 im *Western Blot* gut nachweisbar (Abb.C.13A), nach Immunpräzitation mit dem p300-Antikörper kann es aber nur noch schwach detektiert werden. Dies steht im Einklang mit früheren Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe. Damals konnte mit Hilfe von In-vitro-Bindungsstudien die Interaktionsdomäne von E4ORF3 bereits auf den Aminoterminus (As 1 bis 28) eingegrenzt werden (Täuber, 2002).

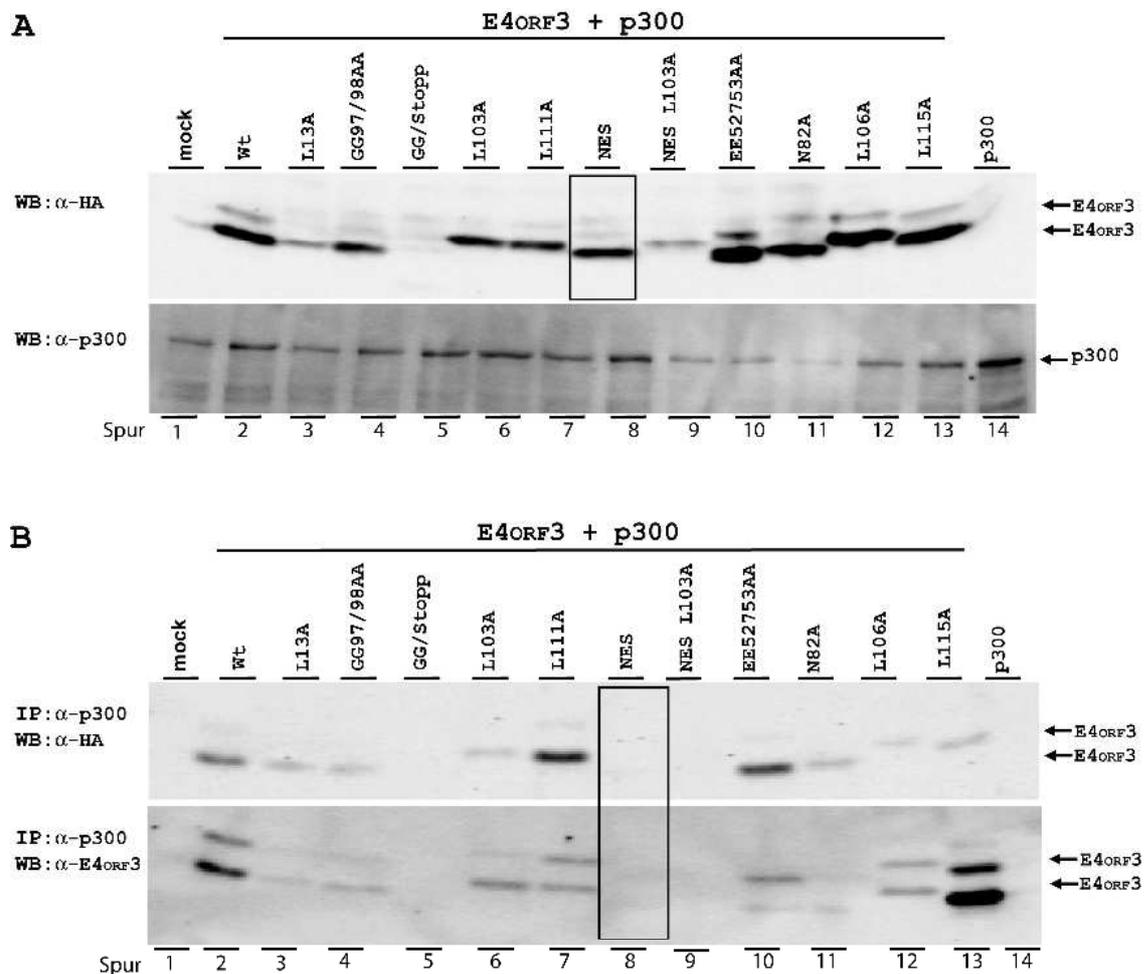


Abb.C.13: Koimmunpräzitationsanalyse von Ad5 E4ORF3-Proteinen mit p300 in BRK1-Zellen

1×10^6 BRK1-Zellen wurden mit je 4 μ g der E4ORF3- und p300-Expressionsplasmide mit Hilfe der Liposomen-Methode (Lipofectamine™ 2000; INVITROGEN, Karlsruhe) transfiziert. Als Negativkontrolle dienten pcDNA3-transfizierte BRK1-Zellen (mock). Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion geerntet. (A) Nach Auftrennung von 300 μ g Gesamtprotein über ein denaturierendes 8%-iges (p300) bzw. 15%-iges (E4ORF3) SDS-Polyacrylamidgel wurde p300 mittels des polyklonalen Antikörpers (C20) (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, Heidelberg) und das E4ORF3-Polypeptid mit Hilfe des monoklonalen HA-spezifischen Antikörpers (3F10) im Immunoblot detektiert. (B) Die Immunpräzitation von 1 mg Gesamtprotein erfolgte mit dem p300-Antikörper C20. Nach Auftrennung des Präzipitats über ein denaturierendes 15%-iges SDS-Polyacrylamidgel wurde E4ORF3 mit 6A11 bzw. mit dem HA-spezifischen Antikörpers 3F10 im Immunoblot detektiert. Das jeweils nachgewiesene Protein ist rechts mit einem Pfeil gekennzeichnet. WB: *Western Blot*; IP: Immunpräzitation.

Eine Aussage darüber, ob neben den Aminosäureaustauschen am Aminoterminus von E4ORF3 auch die Mutation GG/Stopp eine Wechselwirkung mit p300 verhindert, kann aufgrund der zu schwachen Expression dieses E4ORF3-Proteins nicht gemacht werden. Da p300 durch seine intrinsische HAT nicht nur die Azetylierung der Lysinreste von Histonen und einer Vielzahl anderer zellulärer Proteine vermittelt, sondern über seine Bromodomäne an azetylierte Faktoren binden kann, wurde untersucht, ob der einzige Lysinrest innerhalb der Ad5 E4ORF3-Sequenz (K8) Einfluss auf die Interaktion mit p300 hat. Interessanterweise ergibt das Ergebnis der Koimmunpräzipitation, dass der Austausch K8R tatsächlich zu einer verringerten Bindung von E4ORF3 an das p300-Protein führt (Abb.C12B: Spur 4).

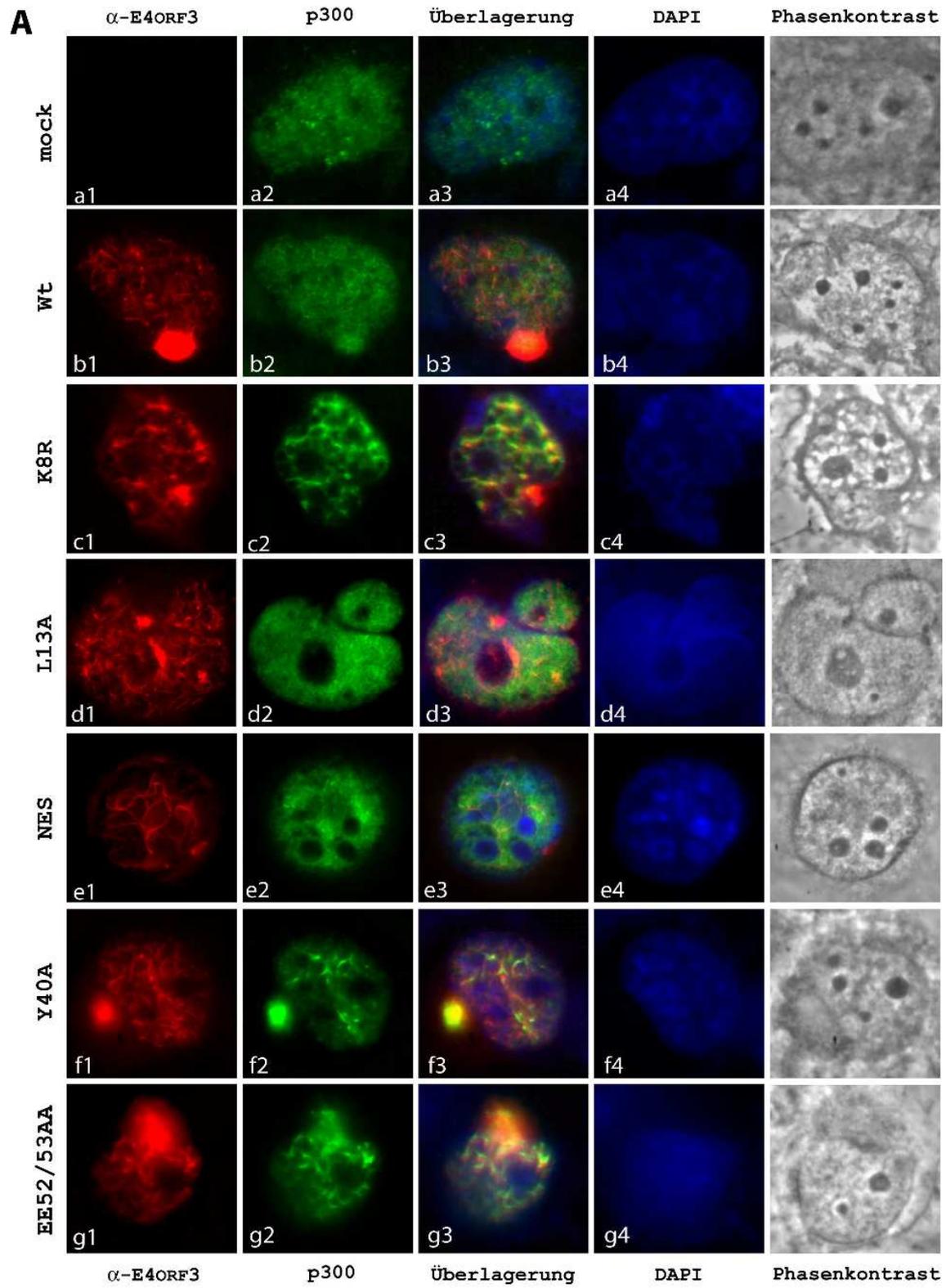
Zusammenfassend kann mit Hilfe dieser Mutationsanalyse Folgendes gezeigt werden: (i) E4ORF3 bindet auch *in vivo* an p300, (ii) die Bindungsdomäne von E4ORF3 an p300 kann weiter, nämlich auf den aminoterminalen Bereich zwischen den Aminosäuren 16 und 28 des viralen E4-Proteins, eingegrenzt werden und (iii) der Austausch des einzigen Lysinrestes (K8R) resultiert in einer signifikanten Abnahme der Interaktion zwischen E4ORF3 und p300. Die Bindung von E4ORF3 erfolgt demnach nicht allein über die Bromodomäne von p300, könnte aber durch die Azetylierung verstärkt werden.

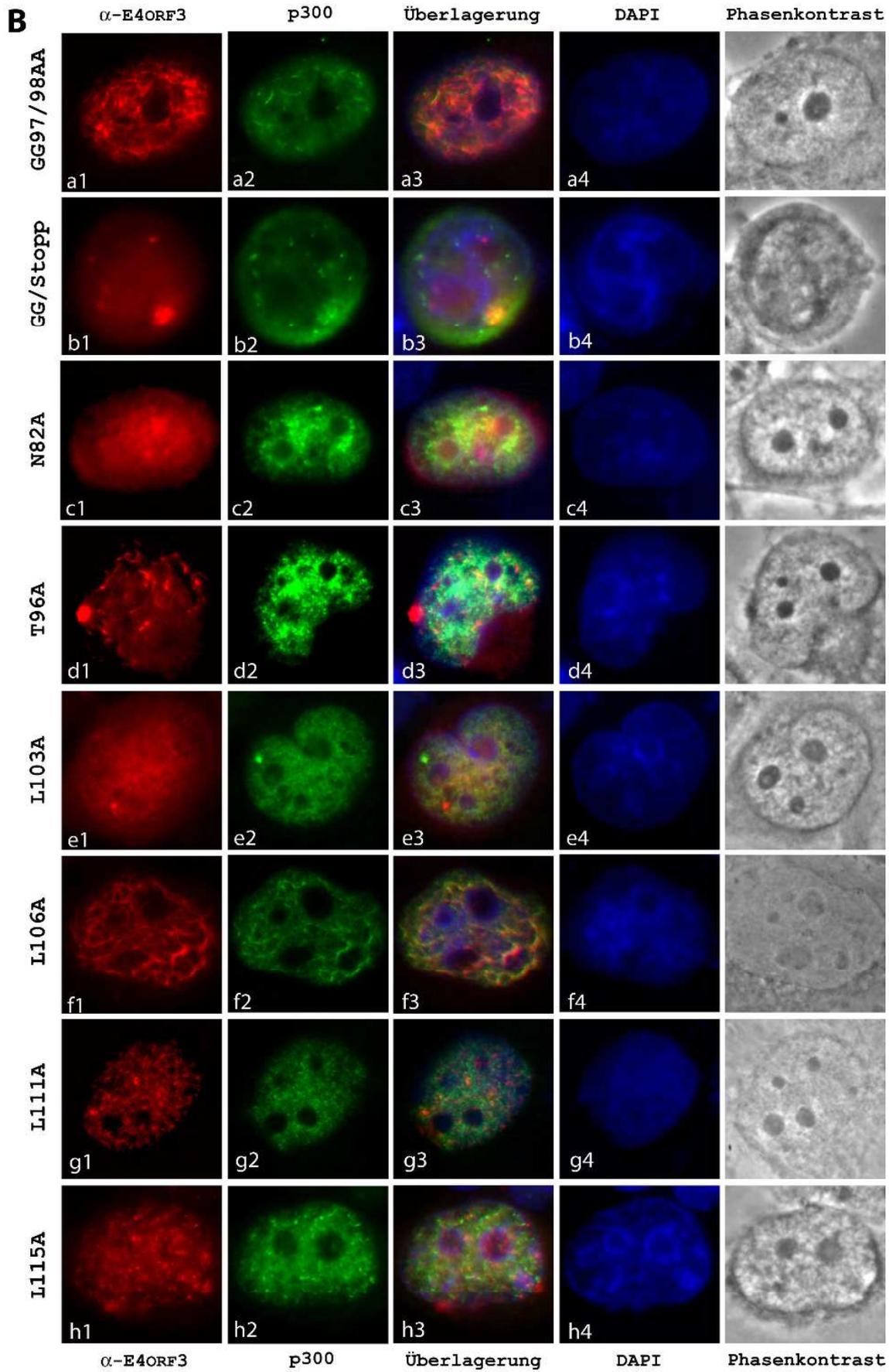
C.11.2 Kolokalisation von Ad5 E4ORF3 und p300 in BRK1-Zellen

Das E4ORF3-Protein, das – wie bereits gezeigt – in elongierten Strukturen im Zellkern vorliegt, ist in der Lage, die diffuse oder grobkörnige Verteilung von p300 aufzuheben und es stattdessen in den E4ORF3-typischen Strukturen anzureichern (Täuber, 2002). Zur weiteren Analyse der Interaktion von p300 mit verschiedenen Ad5 E4ORF3-Varianten wurden Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt (Abb.C.14). Dabei war von Interesse, inwieweit die eingeführten Mutationen die Kolokalisation beider Proteine beeinflussen und ob die E4ORF3-Varianten eine Reorganisation von p300 im Zellkern induzieren können.

Abb.C.14 (siehe S. 89 ff): Lokalisation von Ad5 E4ORF3-Polypeptiden und p300 in BRK1-Zellen

3×10^5 Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät und bei einer Konfluenz von 80 bis 90% mit $1 \mu\text{g}$ der E4ORF3- bzw. p300-Expressionsplasmide mit Hilfe der Liposomen-Methode (Lipofectamine™ 2000; INVITROGEN, Karlsruhe) transfiziert. Als Negativkontrolle dienten pcDNA3-transfizierte BRK1-Zellen (mock). 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mittels Methanol fixiert. (A und B) Der Nachweis des E4ORF3-Proteins erfolgte schließlich mit dem spezifischen E4ORF3-Antikörper 6A11 (a1 bis h1) aus Ratte und dem entsprechenden TR-gekoppelten, sekundären Antikörper. Die Detektion von p300 dagegen geschah mit Hilfe des p300-spezifischen Antikörper C20 (a2 bis h2) und dem entsprechenden FITC-gekoppelten, sekundären Antikörper. Zur Hervorhebung des Zellkerns wurde die DNA mit DAPI angefärbt (a4 bis h4). Die Überlagerung der E4ORF3-, p300- und DAPI-Färbung ist in a3 bis h3 dargestellt. Alle Aufnahmen zeigen eine 1.000-fach vergrößerte Darstellung.





Aufgrund der Ergebnisse ließen sich die verschiedenen E4ORF3-Mutanten in zwei Gruppen einteilen. Zur ersten Gruppe gehören die E4ORF3-Polypeptide (NES, L13A, N82A, T96A, L103A, L111A und L115A), die weder die Reorganisation von p300 induzieren noch eine eindeutige Kolokalisation mit diesem zellulären Protein zeigen (Abb.C.14A: Bild d1 und e1; Abb.C.14B: Bild c1, d1, e1, g1 und h1). Dies gilt für die diffus verteilten E4ORF3-Varianten (N82A, L103A), die keine eindeutigen Aussagen über Reorganisation und eine Kolokalisation zulassen, und punktförmig (L13A, L111A, L115A) (Abb.C.14A: Bild d3; Abb.C.14B: Bild g3 und h3) oder fadenartig (NES, T96A) (Abb.C.14A: Bild e3; Abb.C.14B: Bild d3) lokalisierte Formen, die keinerlei Einfluss auf die p300-Verteilung haben.

Zur anderen Gruppe zählen das Wildtyp-Protein ebenso wie die E4ORF3-Varianten K8R, Y40A, EE52/53AA, GG97/98AA, GG/Stopp und L106A. Diese Polypeptide sind in der Lage, das Verteilungsmuster von p300 zu verändern und mit p300 zumindest partiell zu kolokalisieren. Der Grad der Reorganisation von p300 und der Kolokalisation mit p300 zeigt dabei jedoch deutliche Unterschiede.

Obwohl E4ORF3 Wt keinen deutlichen Einfluss auf die nukleäre Verteilung des p300-Proteins hat, bewirkt es zumindest die Sequestrierung des zellulären Faktors in die kernständigen Strukturen, die auch das E4ORF3-Protein enthalten (Abb.C.14A: Bild b3).

Die E4ORF3-Varianten Y40A und EE52/53AA dagegen weisen nicht nur in kernnahen, zytoplasmatischen Aggregaten, sondern auch innerhalb des Zellkerns eine eindeutige Kolokalisation mit p300 auf. Im Zellkern vermitteln diese E4ORF3-Mutanten die Reorganisation von p300 zu fadenförmigen Strukturen, in welchen auch Y40A (Abb.C.14A: Bild f3) bzw. EE52/53AA (Abb.C.14A: Bild g3) zu finden ist.

Die E4ORF3-Mutante K8R vermittelt zwar die Sequestrierung von p300 in elongierte Strukturen im Zellkern, eine Akkumulation von p300 in zytoplasmatische Aggregate durch K8R ist allerdings nicht zu beobachten (Abb.C.14A: Bild c3).

Bei den E4ORF3-Mutanten GG97/98AA und L106A findet die Kolokalisation mit p300 ausschließlich im Zellkern in unterschiedlich ausgeprägten, fadenartigen und komplexen Strukturen statt. So induziert L106A (Abb.C.14B: Bild f3) die fast vollständige Reorganisation von p300, während in Anwesenheit von GG97/98AA ein Großteil von p300 diffus im Zellkern vorliegt und nur ein geringer Anteil des zellulären Proteins zusammen mit GG97/98AA in den E4ORF3-typischen Strukturen zu finden ist (Abb.C.14B: Bild a3).

Anders verhält es sich bei E4ORF3 GG/Stopp (Abb.C.14B: Bild b3). Zwar hat diese Mutante ebenso wie GG97/98AA keinen Einfluss auf die diffuse Verteilung von p300, dennoch aber ist GG/Stopp in der Lage, im Zellkern und in dessen unmittelbarer Nähe im Zytoplasma die

Bildung punktförmiger p300-Strukturen zu vermitteln, die teilweise mit GG/Stopp kolokalisieren.

Zusammengefasst ergeben die Immunfluoreszenz-Analysen in BRK1-Zellen, (i) dass Mutationen innerhalb von E4ORF3, die eine offensichtliche Kolokalisation mit p300 verhindern, auch die Umstrukturierung dieses zellulären Proteins blockieren und (ii) dass die Kolokalisation beider Faktoren nicht allein durch die NES-abhängige Bindung von E4ORF3 an p300 vermittelt wird. Vielmehr könnten weitere Bereiche des E4-Proteins am Amino- bzw. am Carboxyterminus oder aber auch die Wechselwirkung mit weiteren zellulären Faktoren dafür erforderlich sein.

p300	E4ORF3-Protein	E4ORF3-Strukturen	Kolokalisation mit p300
Reorganisation Kolokalisation	Wt	Fadenartige Strukturen im Zellkern, zytoplasmatische Aggregate	Fadenartige Strukturen im Zellkern, zytoplasmatische Aggregate
	Y40A, EE52/53AA	Fadenartige Strukturen im Zellkern, zytoplasmatische Aggregate	Fadenartige Strukturen im Zellkern, zytoplasmatische Aggregate
	K8R	Fadenartige Strukturen im Zellkern, zytoplasmatische Aggregate	Fadenartige Strukturen im Zellkern
	GG97/98AA, L106A	Fadenartige Strukturen im Zellkern	Fadenartige Strukturen im Zellkern
	GG/Stopp	Diffus und punktförmig im Zellkern	Punktförmige Strukturen im Zellkern
Keine Reorganisation Keine Kolokalisation	N82A, L103A	Diffus und punktförmig im Zellkern bzw. Zytoplasma	
	L13A, L111A, L115A	Punktförmige und fadenartige Strukturen im Zellkern	
	NES, T96A	Fadenartige Strukturen im Zellkern, zytoplasmatische Aggregate (T96A)	

Tab.C.3: Tabellarische Übersicht der E4ORF3-vermittelten Reorganisation des p300-Proteins

C.12 Einfluss von p300 auf die Ausbildung E4ORF3-spezifischer Strukturen in MEF-Zellen

Mit Hilfe der vorangegangenen Immunfluoreszenz-Analysen konnte gezeigt werden, dass die E4ORF3-abhängige Reorganisation von p300 und Kolokalisation mit dem Transkriptionskoaktivator p300 in Säugerzellen neben der NES-vermittelten Interaktion beider Proteine noch weitere Faktoren mit einschließen.

Deshalb sollte im Folgenden überprüft werden, ob p300 allein für die Ausbildung der typischen E4ORF3-Strukturen erforderlich ist. Hierzu wurden Wt- und p300-negative MEF-Zellen mit E4ORF3 Wt-Expressionskonstrukten transient transfiziert.

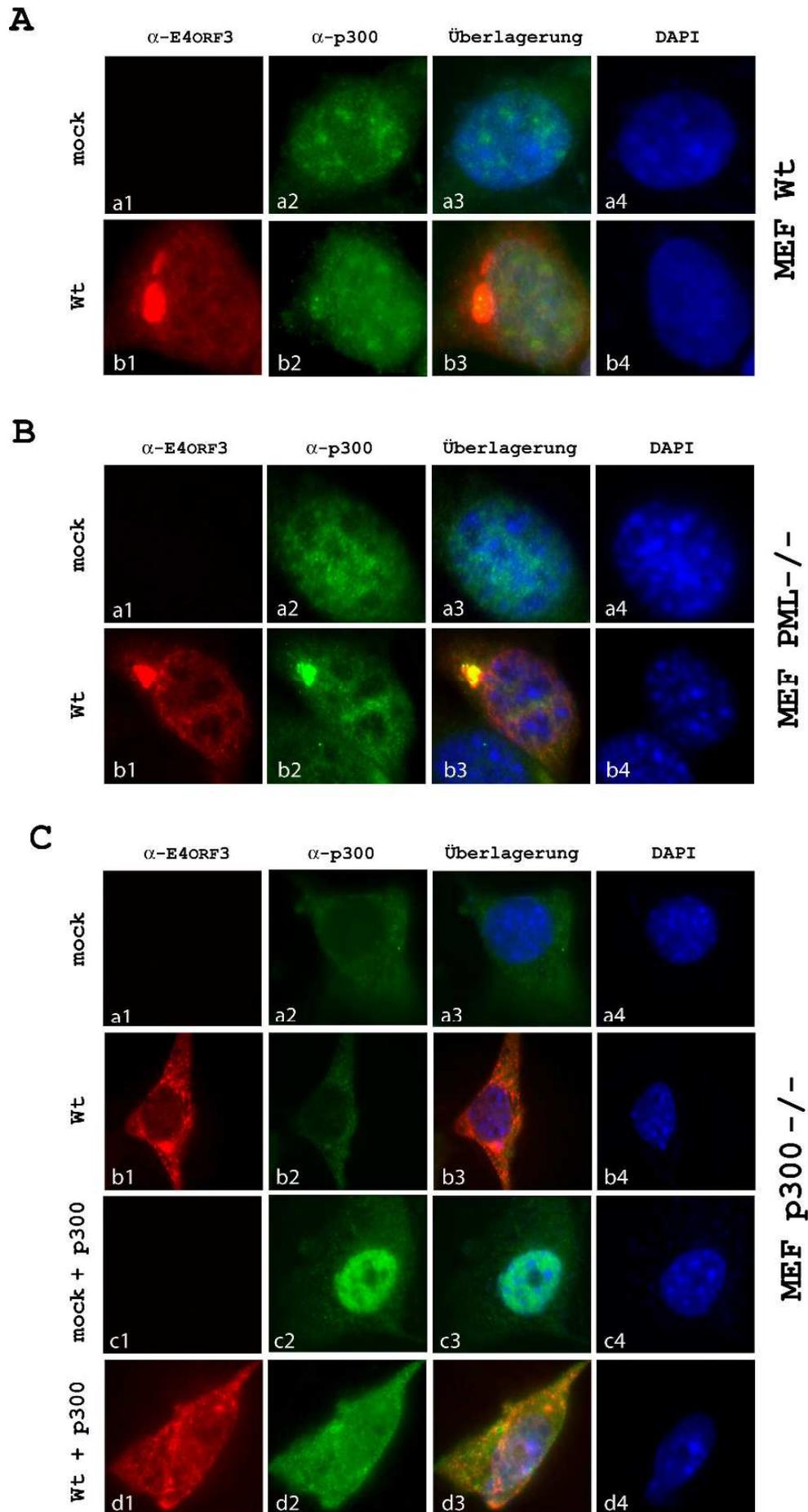
In p300-positiven MEF-Zellen ist E4ORF3 wie erwartet in der Lage, die charakteristischen nukleären und zytoplasmatischen Strukturen auszubilden (Abb.C.15A: Bild b1). In Analogie zu BRK1-Zellen bestätigt das Ergebnis, dass E4ORF3 zusammen mit p300 in zytoplasmatischen Aggregaten bzw PNBs zu finden ist (Abb.C.15A: Bild b3). Wesentlich deutlichere Effekte können sogar in PML-negativen Zellen erzielt werden (Abb.C.15B). Denn in diesen Zellen ist E4ORF3 weitaus weniger in zytoplasmatischen Aggregaten (Abb.C.15B: Bild b1) zu finden als in MEF Wt. Ganz anders verhält sich dagegen p300, das in Abwesenheit von PML verstärkt in diesen Aggregaten vorkommt (Abb.C.15B: Bild b2). In den p300-negativen MEF-Zellen kann hingegen E4ORF3 nicht die typischen elongierten Strukturen im Zellkern bilden (Abb.C.15C: Bild b1). Stattdessen treten gehäuft punktförmige oder stäbchenförmige Formen auf, die in der Mehrzahl im Zytoplasma zu finden sind. Dieser Effekt kann jedoch durch exogene Expression von p300 teilweise rückgängig gemacht werden (Abb.C.15C: Bild d1). Somit bewirkt p300 einerseits eine verstärkte nukleäre Akkumulation von E4ORF3, andererseits bildet es eine wichtige Voraussetzung für die Ausbildung der bekannten fadenförmigen E4ORF3-Strukturen im Zellkern.

Insgesamt erlauben die Untersuchungen mit Hilfe der verschiedenen MEF-Zellen folgende Aussagen. So besitzt (i) PML zwar keinen direkten Einfluss auf die Lokalisation von E4ORF3 und die gebildeten Strukturen, aber auf die Verteilung von p300, da in Abwesenheit von PML p300 verstärkt in den PNBs zu finden ist. Zudem zeigt sich, (ii) dass p300 sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der nukleären Retention von E4ORF3 Wt spielt, indem es durch die Bindung an E4ORF3 möglicherweise dessen NES-Sequenz maskiert und dadurch den nukleozytoplasmatischen Export verhindert. Schließlich ist (iii) p300 alleine ausreichend für die Ausbildung der typischen fadenartigen Strukturen von E4ORF3. Diese Ergebnisse

legen daher die Vermutung nahe, dass nicht PML, sondern p300 der zelluläre Faktor ist, der das eigentliche Zielprotein von E4ORF3 darstellt.

Abb.C.15 (siehe S. 95): p300-abhängige Ausbildung E4ORF3-typischer Strukturen in MEF

Je 1×10^7 MEF-Zellen wurden mit je 5 μg der E4ORF3-Expressionsplasmide mit Hilfe der Elektroporation (1 Puls, 260 V, 1050 μF) transfiziert. Als Negativkontrolle dienten pcDNA3-transfizierte MEF-Zellen (mock). Die MEF Wt-Zellen (**A**), die PML^{-/-} MEF-Zellen (**B**) und die p300^{-/-} MEF-Zellen (**C**) wurden 48 h nach Transfektion mit Methanol fixiert. (**A**, **B** und **C**) Der Nachweis des E4ORF3-Proteins erfolgte schließlich mit dem spezifischen E4ORF3-Antikörper 6A11 (a1 bis d1) und dem entsprechenden TR-gekoppelten, sekundären Antikörper. Die Detektion von p300 geschah mit Hilfe des p300-spezifischen Antikörpers C20 (a2 bis d2) und dem entsprechenden FITC-gekoppelten, sekundären Antikörper. Zum besseren Erkennen des Zellkerns wurde die DNA mit DAPI angefärbt (a4 bis d4). Die Überlagerung der E4ORF3-, p300- und DAPI-Färbung ist in den Bildern a3 bis d3 dargestellt. Alle Aufnahmen wurden mit 1.000-facher Vergrößerung aufgenommen.



C.13 Einfluss von E4ORF3 auf endogene Histonazetyltransferasen

Die beiden Transkriptionskoaktivatoren p300 und CBP spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von zellulären Transkriptionsvorgängen. Eine bedeutende Funktion stellt dabei ihre HAT-Aktivität dar. Durch die Azetylierung aller vier Histone (Schiltz *et al.*, 1999) und einer großen Anzahl von Nicht-Histon-Proteinen, wie p53, p73, Rb und E2F (Gu und Roeder, 1997; Sakaguchi *et al.*, 1998; Martinez-Balbas *et al.*, 2000; Marzio *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2001; Costanzo *et al.*, 2002) können p300/CBP nicht nur die Auflockerung der Chromatinstruktur bewirken, sondern auch die DNA-Affinität regulatorisch wirksamer Nicht-Histon-Proteine und damit die Transkriptionsrate insgesamt erhöhen.

Neben p300/CBP gibt es aber noch eine Vielzahl anderer HAT-Enzyme, die aufgrund ihrer Aminosäuresequenzen, Homologien und ihrer Proteinmotive in zwei weitere HAT-Familien hTAF_{II}250 und GNAT (*Gcn5-related N-actetyltransferase*) eingeteilt werden (zur Übersicht: Hasan und Hottiger, 2002). Der wohl prominenteste Vertreter der letztgenannten Proteinfamilie ist P/CAF (*p300/CBP-associating factor*), der im Komplex mit p300/CBP die transkriptionelle Aktivierung von sehr vielen Genen reguliert. Anders als p300/CBP sind die meisten anderen HAT-Enzyme jedoch nicht in der Lage, alle vier Histon-Proteine gleichermaßen zu azetylieren. Selbst innerhalb des Aminoterminus eines Histons werden bestimmte Lysinreste bevorzugt. So ist beispielsweise bekannt, dass P/CAF hauptsächlich das Lysin¹⁴ von Histon H3, weniger dagegen das Lysin⁸ von H4 modifiziert (Schiltz *et al.*, 1999; Abb.C.16).

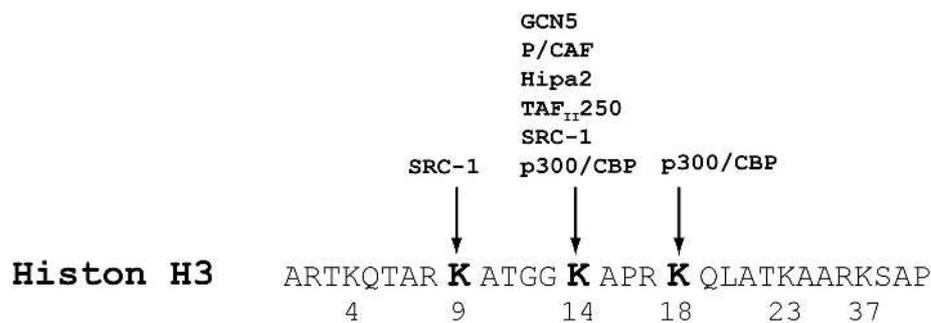


Abb.C.16: Histonazetyltransferasen des Histon H3-Peptids

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz der aminoterminalen Region des humanen Histon H3-Peptids. Die darin enthaltenen Lysinreste sind mit Nummern gekennzeichnet. Die Pfeile geben die Lysine an, die von verschiedenen HAT-Proteinen in In-vitro-Experimenten azetyliert werden. Spezifische, aber weniger bevorzugte Lysinreste einiger HATs sind in diesem Schema nicht dargestellt (nach Sterner und Berger, 2000).

Nachdem im Rahmen dieser Arbeit die Bindung von E4ORF3 und p300 auch *in vivo* nachgewiesen werden konnte, sollte nun die funktionelle Relevanz dieser Interaktion überprüft

werden. Da in unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe von Reporterversuchen bereits gezeigt wurde, dass E4ORF3 die Transkriptionsaktivierung von p300 in BRK1-Zellen inhibieren kann (Täuber, 2002), sollte untersucht werden, ob dieser Effekt von E4ORF3 auf eine Inhibierung der Histonazetylierung zurückzuführen ist (Abb.C.17).

Nachdem eine Modulation der HAT-Aktivität eine mögliche Ursache für das transformierende Potenzial von E4ORF3 darstellen könnte, wurden neben Ad5 E4ORF3 auch E4ORF3-Proteine anderer Adenoviren mit unterschiedlichen, onkogenen Eigenschaften untersucht. Zusätzlich wurden eine Reihe ausgewählter Ad5 E4ORF3-Mutanten in BRK1-Zellen transient exprimiert. Die Ermittlung der endogenen HAT-Aktivität anhand des Histon H3-Peptids (Abb.C.16) in Anwesenheit verschiedener E4ORF3-Proteine erfolgt mit Hilfe eines indirekten ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)-Testsystems nach Angaben des Herstellers (UPSTATE, Lake Placid, USA).

In diesem Versuch dient die endogene HAT-Aktivität pcDNA3-transfizierter Zellen als Referenzwert und wird demzufolge auf 100% normiert. Die Expression von E1A 13S zeigt die erwartete Reduktion der HAT-Aktivität auf 50%. Ein ähnlicher Effekt wird für das Ad5 E4ORF3-Protein beobachtet. Die HAT-Aktivität verringert sich in diesem Fall auf 60%. Darüber hinaus gibt die Einteilung der Adenoviren bezüglich ihrer Onkogenität in Nagetieren keinen Aufschluss über den Einfluss ihrer E4ORF3-Proteine auf die HAT-Aktivität und die transkriptionelle Aktivierung. Denn sowohl bei den hoch onkogenen Adenoviren der Subgruppen A (Ad12) und D (Ad9) als auch bei den nicht onkogenen Vertretern der Subgruppen C (Ad5) und F (Ad40) können deren entsprechende E4ORF3-Proteine die Aktivität endogener HATs entweder positiv oder negativ beeinflussen. Am deutlichsten ist dieser Effekt beim Vergleich zwischen den E4ORF3-Proteinen von Ad40 und Ad5. Während Ad5 E4ORF3 die Aktivität annähernd halbiert, ist Ad40 E4ORF3 in der Lage, die Azetylierung von Histonen nahezu zu verdoppeln.

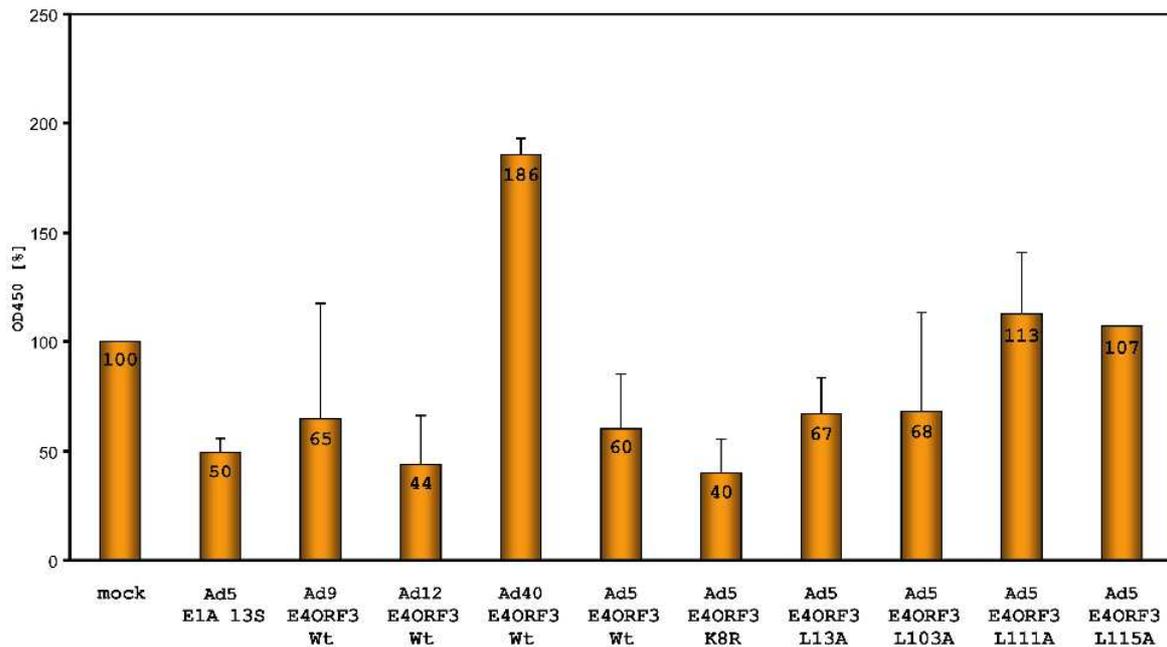


Abb.C.17: Einfluss von verschiedenen E4ORF3-Proteinen auf die Aktivität endogener Histonazetyltransferasen in Bezug auf die Azetylierung von Histon H3-Peptiden.

1 x 10⁶ BRK1-Zellen wurden mit je 4 µg des Ad5 E1A 13S- bzw. der E4ORF3-Expressionsplasmide (pcDNA-HA) mit Hilfe der Liposomen-Methode (Lipofectamine™ 2000; INVITROGEN, Karlsruhe) transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet, die Zellkerne präpariert und daraus Zellkernextrakte hergestellt. Jeweils 1/5 Volumen dieser Kernextrakte wurden für die Analyse der endogenen HAT-Aktivität mit Hilfe des HAT-Tests der Firma UPSTATE, Lake Placid, USA eingesetzt. Als Kontrolle dienten pcDNA3-transfizierte BRK1-Zellen (mock), deren endogene HAT-Aktivität quantitativ bestimmt und auf 100% normiert wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte (Zahlenwerte sind in den Säulen angegeben) und die dazugehörigen Standardabweichungen von drei voneinander unabhängigen (n = 3) Experimenten (Ausnahme: Ad5 E4ORF3 L115A; n = 1).

Mutanten von Ad5 E4ORF3, die nicht imstande sind, p300 zu reorganisieren, und keine eindeutige Kolokalisation mit p300 zeigen, haben entweder keinen Einfluss auf die endogenen HAT-Enzyme (L111A und L115A) oder verhalten sich ähnlich wie das Wildtyp-Protein (L13A, L103A), indem sie die Aktivität auf rund 60% reduzieren. Interessanterweise bewirkt die Mutation des einzigen Lysinrestes und der somit auch einzigen möglichen Azetylierungsstelle eine deutliche Verringerung der HAT-Aktivität auf 40%.

Zusammengefasst können aus diesen Versuchen folgende Schlüsse gezogen werden. Demnach ist (i) der negative Effekt von E4ORF3 auf die Transkriptionsaktivierung durch p300 unter anderem auf die Inhibierung der Histonazetylierung zurückzuführen, ist (ii) dieser negative Effekt nicht von der Reorganisation des p300-Proteins abhängig, kann (iii) dieser Effekt noch verstärkt werden, wenn die einzig mögliche Azetylierungsstelle innerhalb von Ad5 E4ORF3 zerstört ist und schließlich zeigt (iv) Ad5 E4ORF3 auch auf funktioneller Ebene Übereinstimmungen mit Ad5 E1A.

C.14 Azetylierung von Ad5 E4ORF3 *in vivo*

Die Ergebnisse dieser und früherer Arbeiten deuten stark darauf hin, dass E4ORF3 und E1A redundante Funktionen in der Regulation der Transkription haben. Denn E4ORF3 ist ebenso wie E1A in der Lage, an p300 zu binden (Moran, 1993; Eckner *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1996) und sowohl die HAT-Aktivität von p300/CBP *in vitro* und die Azetylierung von Histonen zu blockieren (Chakravarti *et al.*, 1999; Hamamori *et al.*, 1999). Da es E1A darüber hinaus gelingt, p300/CBP so gezielt zu modulieren, dass es trotz der Inhibierung der Histonazetylierung noch selbst von p300/CBP an Lysin²³⁹ azetyliert wird (Zhang *et al.*, 2000), wurde untersucht, ob auch E4ORF3 als Substrat von p300/CBP oder anderen HAT-Enzymen fungiert (Abb.C.18).

Hierzu wurde wiederum das E4ORF3 Wt-Protein und die E4ORF3-Varianten K8R und L103A transient in BRK1-Zellen exprimiert. Der Nachweis der E4ORF3-Proteine erfolgte zunächst durch Immunpräzipitation mit dem E4ORF3-spezifischen Antikörper (Abb.C.18A Mitte). Das Ergebnis zeigt, dass die Gleichgewichtsmengen des Wildtyp-Proteins und der E4ORF3-Variante K8R annähernd gleich sind (Abb.C.18A: Spur 6 und 7). Eine deutlich geringere Gleichgewichtsmenge tritt dagegen bei der Mutante L103A auf (Abb.C.18A: Spur 8). Die im Anschluss durchgeführte Bindungsanalyse und die Detektion der E4ORF3-bindenden Proteine mit dem Azetyl-Lysin- und E4ORF3-spezifischen Antikörper ergibt dabei folgendes Bild (Abb.C.18A links): Demnach wird das Wildtyp-Protein am einzigen Lysinrest an Position 8 azetyliert (Abb.C.18A: Spur 2). Die Mutante L103A, die ebenso wie p300/CBP im Zellkern eine diffuse Verteilung aufweist, wird bezogen auf die Proteingesamtmenge sogar in einem noch höheren Maße modifiziert (Abb.C.18A: Spur 4). Anders verhält sich dagegen die Modifizierungs-defiziente E4ORF3-Variante K8R (Abb.C.18A: Spur 3). Der Austausch des einzigen Lysins innerhalb der gesamten E4ORF3-Sequenz resultiert in einer drastischen Abnahme der Menge an azetyliertem Protein. Da es sich bei dieser azetylierten Form (*) jedoch nicht um E4ORF3 handeln kann, liegt die Vermutung nahe, dass dieses zelluläre Protein in geringem Maße mit E4ORF3 interagiert und selbst azetyliert wird. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass durch die Verwendung hoher Mengen an Proteinlysate (8 mg) unspezifische Kreuzreaktionen auftreten, die durch den sekundären Antikörper hervorgerufen werden.

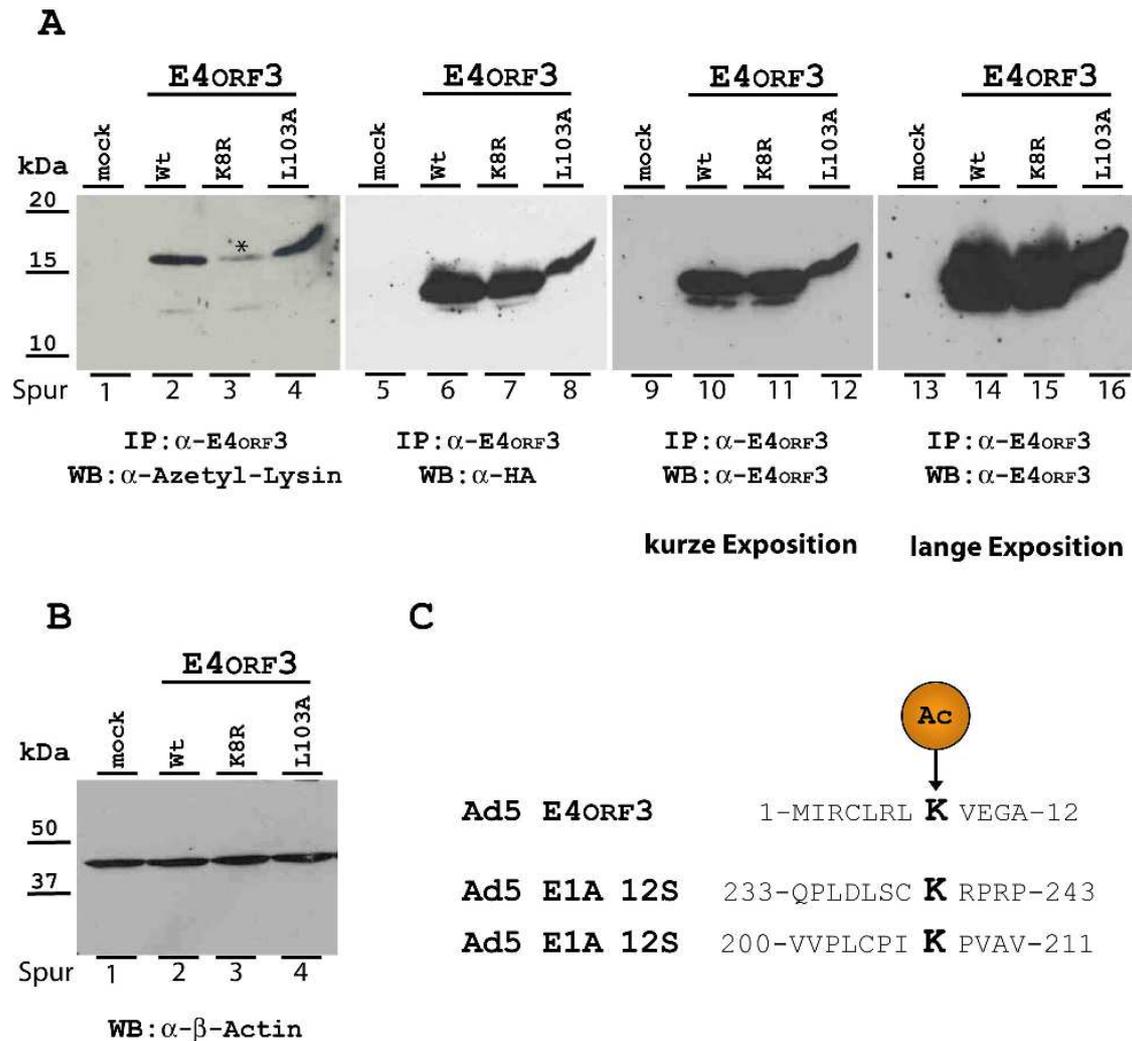


Abb.C.18: Azetylierung von Ad5 E4ORF3-Proteinen in BRK1-Zellen

1 x 10⁶ BRK1-Zellen wurden mit je 4 µg der HA-E4ORF3-Expressionsplasmide mit Hilfe der Liposomen-Methode (Lipofectamine™ 2000; INVITROGEN, Karlsruhe) transfiziert. Als Negativkontrolle dienten pcDNA3-transfizierte BRK1-Zellen (mock). Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion geerntet. **(A)** Die Immunpräzipitation von 8 mg Gesamtprotein erfolgte mit dem E4ORF3-spezifischen Antikörper 6A11. Nach Auftrennung des Präzipitats über ein denaturierendes 15%-iges SDS-Polyacrylamidgel wurde das E4ORF3-Polypeptid zunächst mit Hilfe des monoklonalen Azetyl-Lysin-Antikörpers (**links**) und anschließend mit dem HA-spezifischen Antikörper 3F10 (**Mitte**) und E4ORF3-spezifischen Antikörper 6A11 (**rechts**, kurze und lange Exposition) im Immunoblot detektiert. **(B)** Nach Auftrennung von 100 µg Gesamtprotein über ein denaturierendes 15%-iges SDS-Polyacrylamidgel wurde β-Actin mittels des monoklonalen β-Actin-Antikörpers (SIGMA, München) im Immunoblot detektiert. **(C)** Schematische Darstellung der aminoterminalen Region des E4ORF3-Proteins mit dem einzigen Lysinrest von Ad5 E4ORF3. Das Sternchen (*) unter A markiert möglicherweise ein azetyliertes Protein unbekannter Herkunft. WB: *Western Blot*; IP: Immun-präzipitation.

Mit Hilfe dieser Bindungsstudien konnten zwei wichtige Beobachtungen gemacht werden. So wird (i) das E4ORF3-Protein am Lysin⁸ azetyliert, obwohl es selbst die Azetylierung von Histonen blockieren kann und es wird (ii) trotz der veränderten Lokalisation und des Fehlens der typischen elongierten E4ORF3-Strukturen eine große Fraktion der Variante L103A modifiziert.

C.15 Bindung von Ad5 E4ORF3 an Tumorsuppressor p53 *in vivo*

Die beiden frühen Proteine E1A und E4ORF3 zeigen eine große Übereinstimmung bei der Regulation von HAT-Enzymen, da sie zwar die Azetylierung von Histonen verhindern, aber unabhängig davon selbst modifiziert werden. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass E1A darüber hinaus auch die p300-abhängige, carboxyterminale Azetylierung des Tumorsuppressors p53 (Gu und Roeder, 1997; Liu *et al.*, 1999) blockiert (Chakravarti *et al.*, 1999). Aufgrund der beschriebenen Ähnlichkeiten beider adenoviraler Proteine in Hinblick auf die Modulation der p300-Funktionen, wurde in dem folgenden Versuch untersucht, ob E4ORF3 (indirekt über p300) an p53 bindet und ob es ebenso wie E1A einen Einfluss auf dessen Azetylierung hat.

Hierzu wurden BRK1-Zellen mit den entsprechenden E4ORF3-Expressionskonstrukten transient transfiziert (Abb.C.19). Der Nachweis der jeweiligen E4ORF3-Proteinmengen erfolgte zunächst mit Hilfe der direkten Immunpräzipitation von E4ORF3 (Abb.C.19B). Auch hier zeigt die Mutante L103A im Vergleich zum Wildtyp-Protein und der Azetylierungsdefizienten Variante K8R deutlich niedrigere E4ORF3-Gleichgewichtsmengen (Abb.C.19B: Spur 4). Bei den Koimmunpräzipitationsexperimenten mit E4ORF3 konnte sowohl beim Wildtyp-Protein als auch bei den beiden E4ORF3-Mutanten eine Bindung an p53 beobachtet werden (Abb.C.19A links). E4ORF3 L103A bindet gemessen an seiner geringeren Expression sogar mehr p53 (Abb.C.19A: Spur 4). Um der Frage nachzugehen, wie viel des gebundenen p53 tatsächlich azetyliert vorliegt, wurde ein weiteres Koimmunpräzipitationsexperiment mit E4ORF3 durchgeführt. Das Ergebnis (Abb.C.19A rechts) zeigt, dass sowohl E4ORF3 Wt als auch die Variante L103A nur geringe Mengen an azetyliertem p53 binden (Abb.C.19A: Spur 6 und 8). Anders dagegen verhält sich E4ORF3 K8R, das zwar selbst nicht azetyliert wird, dafür aber mit einer größeren Mengen an entsprechend modifizierten Tumorsuppressor interagieren kann (Abb.C.19A: Spur 7).

Zusammenfassend konnte mit Hilfe dieser Experimente gezeigt werden, dass (i) E4ORF3 (direkt oder indirekt) mit p53 *in vivo* interagieren kann, dass (ii) diese Interaktion zwar unabhängig von den E4ORF3-spezifischen elongierten Strukturen erfolgt, aber (iii) durchaus von der subzellulären Verteilung des E4ORF3-Proteins beeinflusst wird, da das vermehrt im Zytoplasma vorkommende L103A mehr p53 bindet als das überwiegend nukleäre Wildtyp-Protein und dass (iv) die Inhibierung der E4ORF3-Azetylierung (K8R) zu einer gesteigerten Bindung von azetyliertem p53 an E4ORF3 führt. Insgesamt bestätigt das Ergebnis die Vermutung, dass E4ORF3 ähnliche Funktionen wie E1A erfüllen kann.

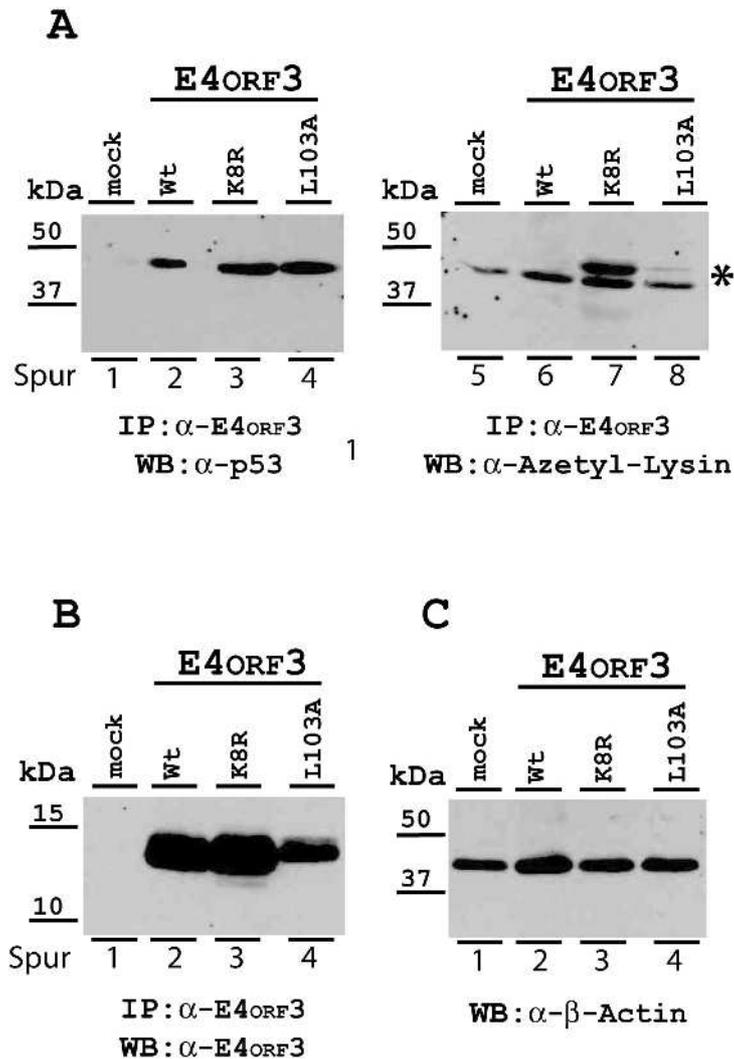


Abb.C.19: Koimmunpräzitationsanalyse von Ad5 E4ORF3-Proteinen mit p53 in BRK1-Zellen

1×10^6 BRK1-Zellen wurden mit je $4 \mu\text{g}$ der E4ORF3- und p300-Expressionsplasmide mit Hilfe der Liposomen-Methode (Lipofectamine™ 2000; INVITROGEN, Karlsruhe) transfiziert. Als Negativkontrolle dienten pcDNA3-transfizierte BRK1-Zellen (mock). Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion geerntet. (A) Die Immunpräzitation von 5 mg Gesamtprotein erfolgte jeweils mit dem E4ORF3-spezifischen Antikörper 6A11. Nach Auftrennung des Präzipitats über ein denaturierendes 15%-iges SDS-Polyacrylamidgel wurde zunächst die Gesamtmenge an p53 mit dem p53-spezifischen Antikörper FL393 (**links**) und das azetylierte p53-Protein (*) mit Hilfe des Azetyl-Lysin-spezifischen monoklonalen Antikörpers (**rechts**) im Immunoblot detektiert. (B) Die Immunpräzitation von 1 mg Gesamtprotein erfolgte mit dem E4ORF3-spezifischen Antikörper 6A11. Nach Auftrennung des Präzipitats über ein denaturierendes 15%-iges SDS-Polyacrylamidgel wurde das E4ORF3-Polypeptid mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 6A11 im *Western Blot* nachgewiesen. (C) Nach Auftrennung von $100 \mu\text{g}$ Gesamtprotein über 15%-iges SDS-Polyacrylamidgel wurde β -Actin mittels des monoklonalen β -Actin-Antikörpers (SIGMA, München) im Immunoblot detektiert. WB: *Western Blot*; IP: Immunpräzitation.

C.16 Zusammenfassung (II): E4ORF3 und p300

Obwohl das Ad5 E4ORF3-Protein maßgeblich für die Modulation der PML NBs verantwortlich ist (Carvalho *et al.*, 1995; Puvion-Dutilleul *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996), mehren sich die Hinweise, dass es sich um einen indirekten Effekt handelt, der vermutlich nicht auf eine direkte Interaktion zwischen E4ORF3 und PML zurückzuführen ist (Nevels *et al.*, 1999b). Somit liegt die Vermutung nahe, dass E4ORF3 mit anderen PML NB-Komponenten interagiert. Da gezeigt wurde, dass neben E4ORF3 auch E1A, ein weiteres frühes adenovirales Protein, mit den PML NBs assoziiert stellte dessen Bindungspartner p300/CBP (Subramanian *et al.*, 1988; Whyte *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1993) auch einen potenziellen Interaktionspartner von E4ORF3 dar.

Zusammen mit den Ergebnissen früherer Arbeiten unserer Arbeitsgruppe ergibt sich dabei folgendes Bild. Demzufolge

- bindet E4ORF3 p300 *in vitro* (Täuber, 2002).
- kann auch eine Interaktion mit p300 *in vivo* beobachtet werden.
- wird die Bindung an p300 über den Aminoterminus von E4ORF3 (NES; As 16 bis 24) vermittelt.
- liegen die Interaktionsbereiche von p300 im Bereich des Aminoterminus und innerhalb der CH3-Domäne (Täuber, 2002).
- ist p300 verantwortlich für die nukleäre Retention von E4ORF3 und die Ausbildung der bekannten E4ORF3-Strukturen.
- inhibiert E4ORF3 die p300-abhängige Transkriptionsaktivierung (Täuber, 2002).
- blockiert E4ORF3 die Azetylierung von Histonen *in vitro* und von p53 *in vivo*.
- kann in diesem Zusammenhang sogar eine Wechselwirkung mit p53 gezeigt werden.
- beeinflusst E4ORF3 nicht nur die Azetylierung von Histon und Nicht-Histon-Proteinen, sondern wird dabei selbst auch azetyliert.
- bewirkt E4ORF3, das selbst nicht azetyliert wird, eine verstärkte Bindung an azetyliertes p53-Protein.
- hat E4ORF3 eine große Ähnlichkeit mit E1A auf funktioneller Ebene (spezifische Regulation der HAT-Aktivität).

C.17 Analysen des transformierenden Potenzials von E4ORF3-Varianten

Bei der Analyse transformierender Eigenschaften macht man sich die grundlegende Eigenschaft primärer Zellen zunutze, sich nur begrenzt teilen zu können. Im Gegensatz zu unbegrenzt wachsenden Tumorzellen stellen primäre Zellen nach einer gewissen Anzahl von Teilungen das Wachstum ein und erreichen einen Zustand replikativer Seneszenz (Hayflick, 1965). Dieser Wachstumsstopp kann jedoch durch Inkubation der Zellen mit transformierenden Agenzien (oder durch die Akkumulation spontaner Mutationen) verhindert oder aufgehoben werden. Einzelne, transformierte Zellen können nach vier bis sechs Wochen zu mehrschichtige Kolonien (*Foci*) auswachsen. Diese Zellen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zu unbegrenztem Wachstum, durch den Verlust der Kontaktinhibition und durch eine verminderte Serumabhängigkeit aus.

Für alle untersuchten Vertreter der Gruppe der Adenoviren konnte gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, primäre Rattenzellen in Zellkultur zu transformieren. Nachdem diese Eigenschaft anfangs allein den beiden frühen Genprodukten E1A und E1B zugeschrieben wurde (zur Übersicht: Bernards und van der Eb, 1984; Graham, 1984; Shenk, 1996), fand man Ende des letzten Jahrhunderts heraus, dass auch Genprodukte der E4-Region, E4ORF3 (Täuber, 1998; Nevels *et al.*, 1999b) und E4ORF6 (Nevels *et al.*, 1999a), über ein transformierendes Potenzial verfügen. Transformationsversuche ergaben nämlich, dass E4ORF3 ebenso wie E4ORF6 die Anzahl stabil transformierter *Foci* in Kooperation mit E1A und E1A-E1B deutlich steigert (Täuber, 1998; Nevels *et al.*, 1999b). Die aus den *Foci* etablierten Zelllinien zeigten signifikante, aber im Vergleich zu E4ORF6 schwächer ausgeprägte Veränderungen hinsichtlich der Zellmorphologie, des Wachstums unter reduzierten Serumkonzentrationen und einer gesteigerten Tumorinduktion in Nacktmäusen.

Außerdem sind beide E4-Genprodukte dazu in der Lage, die E1B-Funktion bei der Transformation primärer Zellen zu ersetzen. Interessanterweise verläuft die durch E1A- und E4-vermittelte Transformation nicht nach den klassischen Prinzipien der E1-induzierten Transformation, sondern beruht auf einem anderen, den so genannten „*hit & run*“-Mechanismus (Nevels *et al.*, 2001). Der wesentliche Unterschied besteht darin, dass bei der klassischen E1-Transformation die viralen Sequenzen beider Gene in den transformierten Zellen persistieren, während bei der E1A-E4-vermittelten „*hit & run*“-Transformation keine E4- und nur in seltenen Fällen E1A-spezifische DNA-Fragmente nachweisbar sind (Nevels *et al.*, 2001).

E4ORF3 stellt demnach das zweite bekannte Genprodukt der E4-Region dar, das ein onkogenes Potenzial besitzt und in Kooperation mit E1A in der Lage ist, primäre Zellen auch in

Abwesenheit der eigenen DNA-Sequenzen nach dem Prinzip des „hit & run“-Mechanismus zu transformieren.

C.17.1 Analyse des transformierenden Potenzials von E4ORF3-Varianten in Kooperation mit E1

Bisherige Analysen in unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass Ad5 E4ORF3 ebenso wie Ad5 E4ORF6 in Kooperation mit den Proteinen der E1-Region ein transformierendes Potenzial besitzt. Darüber hinaus konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass das transformierende Potenzial von E4ORF3 in der Hauptsache durch den aminoterminalen und zentralen Bereich vermittelt wird. Der Carboxyterminus des E4-Proteins besitzt hingegen einen negativen Einfluss auf die Transformation. (Täuber, 1998; Nevels *et al.*, 1999b, Täuber, 2002). Um nun die Bereiche innerhalb des E4ORF3-Proteins weiter einzugrenzen, die zur Transformation beitragen, wurden verschiedene Ad5 E4ORF3-Mutanten aber auch E4ORF3-Proteine anderer Serotypen (Ad9, Ad12, Ad40) in Transformationsversuchen getestet (Abb.C.20).

Mit Hilfe dieser Versuche konnte bestätigt werden, dass Ad5 E4ORF3 die *Focus*-bildende Aktivität der E1-Region in primären Rattennierenzellen erhöht. Eine um den Faktor 1,5 höhere Transformationsrate konnte bei Ad12 E4ORF3 beobachtet werden. Dagegen zeigt das Ad9 E4ORF3-Protein nur einen mäßigen Einfluss auf die *Focus*-Bildung. Dies steht im Einklang mit den von Javier und Kollegen bereits veröffentlichten Ergebnissen (Thomas *et al.*, 2001), nach denen dem Ad9 E4ORF3-Proteine keine transformierenden Eigenschaften zugeschrieben werden konnten. Das E4ORF3-Protein des nicht onkogenen Adenovirus Ad40 wies einen deutlich negativen Effekt auf die Transformation auf. So konnte hier eine Reduktion der *Foci* auf die Hälfte festgestellt werden. Obwohl die E4ORF3-Proteine der untersuchten Serotypen in vielen Bereichen hoch konserviert sind, zeigen sich deutliche Unterschiede in ihrem transformierenden Potenzial. Dies bedeutet, dass nicht nur diese homologen, sondern auch die nicht konservierten Regionen die transformierenden Eigenschaften dieses E4-Proteins determinieren. Somit besteht kein Zusammenhang zwischen der Einteilung der verschiedenen Adenoviren in hoch onkogen (Ad12: 159%, Ad9: 93%) bzw. nicht onkogen (Ad5: 132%, Ad40: 57%) und dem transformierenden Potenzial ihrer E4ORF3-Proteine.

Bei der Analyse der Ad5 E4ORF3-Proteine hatten die zentralen Ad5 E4ORF3-Varianten N82A und GG97/98AA im Vergleich zum Ad5 Wildtyp-Protein einen negativen Einfluss auf die Transformation. Hier konnte man eine Verringerung der *Focus*-Bildung um den Faktor zwei

beobachten. Die aminoterminalen Mutanten K8R und L13A führten ebenfalls zu einer Reduktion der *Focus*-Zahl, taten dies aber nur in einem geringeren Ausmaße.

Bemerkenswerterweise verdoppelten die carboxyterminalen Mutanten GG/Stopp, L106A, und L115A die *Focus*-Zahl, während die E4ORF3-Varianten L103A und L111A nur mäßige positive Effekte auf die Transformation zeigten.

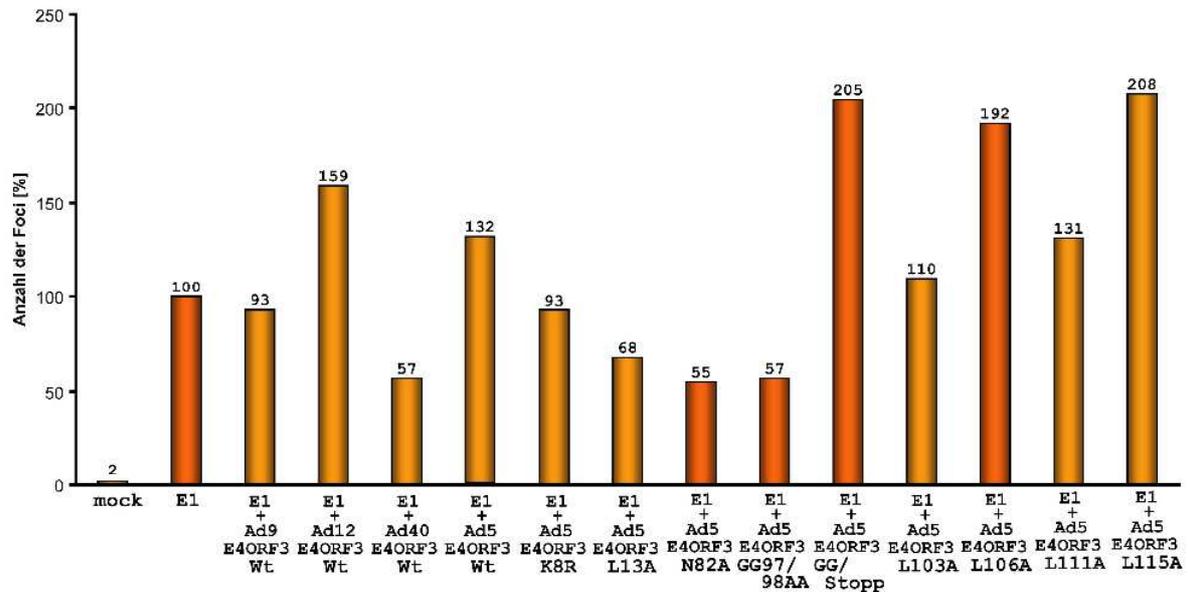


Abb.C.20: Transformierendes Potenzial von E4ORF3-Mutaten in Kooperation mit Ad E1

Primäre BRK-Zellen wurden mit je 3 µg pXC15 (E1) und 1 µg von jeweils einem der folgenden pcDNA3-HA-Expressionskonstrukte Ad9 E4ORF3 Wt, Ad12 E4ORF3 Wt, Ad40 E4ORF3 Wt, Ad5 E4ORF3 Wt, Ad5 E4ORF3 K8R, Ad5 E4ORF3 L13A, Ad5 E4ORF3 N82A, Ad5 E4ORF3 GG97/98AA, Ad5 E4ORF3 GG/Stopp, Ad5 E4ORF3 L103A, Ad5 E4ORF3 L106A, Ad5 E4ORF3 L111A, Ad5 E4ORF3 L115A mittels der CaHPO₄-Präzipitations-Methode transfiziert. Als Negativkontrolle dienten pcDNA3-HA-transfizierte primäre BRK-Zellen (mock). 6 Wochen nach Transfektion wurden die entstandenen *Foci* mit Kristallviolett angefärbt und ausgezählt. Dargestellt sind die auf E1-normierten Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (n = 3) (Ausnahme: Ad5 E4ORF3 L106A; n = 2).

Insgesamt konnte die Analyse verschiedener E4ORF3-Mutanten keine weitere Eingrenzung der für die Transformation relevanten Bereiche seitens des E4ORF3 erzielen. Dennoch konnte mit Hilfe dieser Transformationsversuche die früheren Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden (Täuber, 2002). Denn Mutationen im Aminoterminus (K8R, L13A) und im zentralen Bereich (N82A, GG97/98AA) von Ad5 E4ORF3 haben einen negativen Effekt auf die Transformationsraten in Rattennierenzellen. Im Gegensatz dazu besitzt der Carboxyterminus einen negativen Einfluss auf die Transformation, da sowohl die Deletion des

Carboxyterminus (GG/Stopp) sowie Mutationen in diesem Bereich (L103A, L106A, L111A und L115A) die *Focus*-Bildung dieser E4ORF3-Mutanten gegenüber E4ORF3 Wt steigert.

C.17.2 Analyse des transformierenden Potenzials von E4ORF3-Varianten in Kooperation mit E1A

Frühere Studien unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass E4ORF3 nicht nur in Kooperation mit der E1-Region, sondern auch zusammen mit E1A allein primäre Rattenzellen transformieren kann (Nevels *et al.*, 2001). Aus diesem Grund sollten nun die Effekte gezielter Mutationen von E4ORF3 auf die „hit & run“-Transformationen untersucht werden. Dazu wurden die verschiedenen Ad5 E4ORF3-Mutanten in den E1A-E4ORF3-Transformationsversuchen getestet (Abb.C.21).

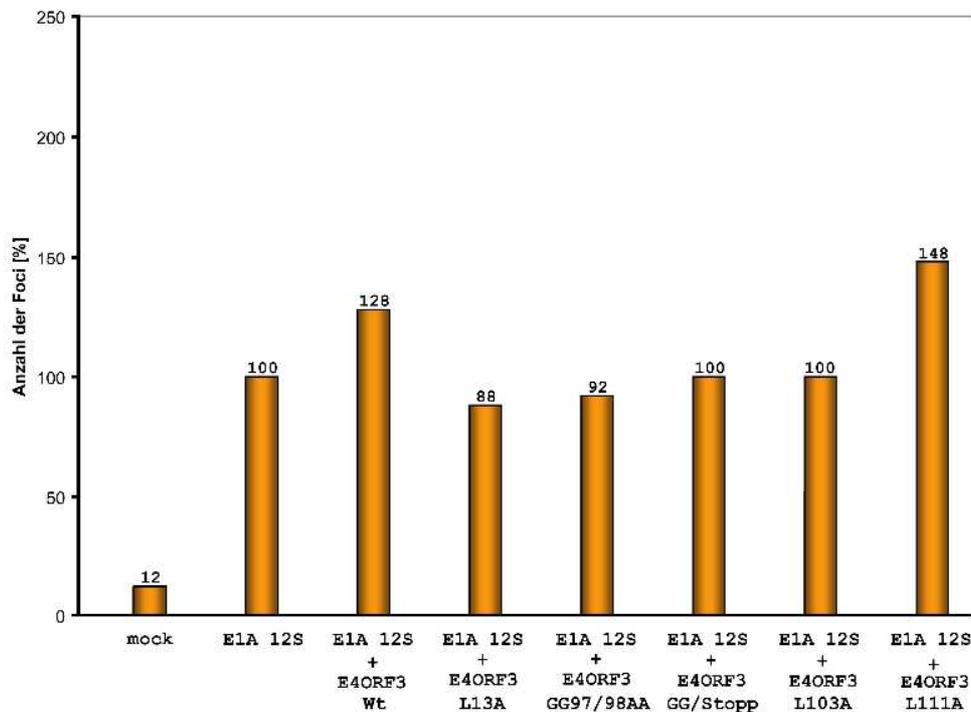


Abb.C.21: Transformierendes Potenzial von E4ORF3-Mutaten in Kooperation mit Ad E1A 12S

Primäre BRK-Zellen wurden mit je 1,5 µg pCMV-E1A und 1,0 µg von einem der folgenden pcDNA3-HA-Expressionskonstrukte Ad5 E4ORF3 Wt, Ad5 E4ORF3 L13A, Ad5 E4ORF3 GG97/98AA, Ad5 E4ORF3 GG/Stopp, Ad5 E4ORF3 L103A, Ad5 E4ORF3 L111A mittels der CaHPO₄-Präzipitations-Methode transfiziert. Als Negativkontrolle dienten pcDNA3-HA-transfizierte primäre BRK-Zellen (mock). 6 Wochen nach Transfektion wurden die entstandenen Zellklone mit Kristallviolett angefärbt und ausgezählt. Dargestellt sind die auf E1A 12S-normierten Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (n = 3).

Anhand dieser Versuche wird bestätigt, dass E1A alleine ein transformierendes Potenzial besitzt, welches in Kooperation mit E4ORF3 Wt merklich gesteigert werden kann. Bei den beiden E4ORF3-Mutanten L13A und GG97/98AA ist dagegen eine leichte Reduktion der Focus-

Bildung feststellbar. Ihre Fähigkeit in Kooperation mit E1A, *Foci* auszubilden, liegt bei ca. 90% der E1A-Transformationsrate. Mutationen im Carboxyterminus (GG/Stopp, L103A) hingegen haben keinen Einfluss auf die Anzahl der *Foci*. Bei gleichzeitiger Expression dieser Mutanten mit E1A können genau so viele *Foci* detektiert werden wie mit E1A alleine. Einzige Ausnahme unter den carboxyterminalen Mutanten bildet E4ORF3 L111A. Diese E4ORF3-Variante weist mit ca. 150% sogar ein höheres transformierendes Potenzial auf als das Wildtyp-Protein.

Zusammengefasst scheint hier der Carboxyterminus entweder keinen (GG/Stopp, L103A) oder einen negativen Effekt (L111A) auf die Transformation zu besitzen, während das transformierende Potenzial von E4ORF3 in der Hauptsache über dessen Aminoterminus und zentralen Bereich vermittelt wird. Doch anders als in Transformationsexperimenten in Kooperation mit der E1-Region sind die zusammen mit E1A 12S beobachteten Effekte der E4ORF3-Varianten nur schwach ausgeprägt. Dies ist möglicherweise auf die lediglich transiente Expression von E1A und E4ORF3 zurückzuführen, da in diesen E1A-E4ORF3-transformierten Zelllinien keine *E4*- und nur in wenigen Ausnahmefällen *E1a*-spezifische DNA-Sequenzen nachgewiesen werden können (Nevels *et al.*, 2001). Andersherum betrachtet besteht aber auch die Möglichkeit, dass durch die Interaktion von E4ORF3 mit beispielsweise E1B-55kDa synergistische Effekte auftreten, die in Kooperation mit E1A 12S allein nicht wirken können.

C.18 Bestimmung des mutagenen Potenzials ausgewählter E4ORF3-Varianten

Nachdem in den beiden vorangegangenen Untersuchungen das transformierende Potenzial von E4ORF3 in Kooperation mit E1A bzw. der E1-Region genauer bestimmt und dem Aminoterminus sowie dem zentralen Bereich des E4ORF3-Proteins zugeordnet worden ist, sollte im Folgenden ermittelt werden, ob diese Regionen von E4ORF3 auch mutagene Eigenschaften aufweisen (Abb.C.22).

Dazu wurde ein etabliertes System verwendet, das ursprünglich zur Untersuchung des mutagenen Potenzials von DNA-Viren in Säugerzellen entwickelt wurde. Es ermöglicht die Bestimmung von Mutationshäufigkeiten am X-chromosomalen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase(*hgprt*)-Genlocus (zur Übersicht: Stout und Caskey, 1985). Dessen Genprodukt HGPRT besitzt eine wichtige Funktion bei der Wiederverwertung von Purinen, ist

aber für die Lebensfähigkeit der Zelle nicht essentiell. In Anwesenheit von 6-Thioguanin (2-Amino-6-Mercaptopurin) jedoch entsteht durch die HGPRT-induzierte Umwandlung des Purinanalogs ein toxisches Nukleotid, das zum Zelltod führt. Zellen mit Mutationen innerhalb des *hgprt*-Gens, die einen Verlust der Enzymaktivität zur Folge haben, können dagegen überleben und Kolonien ausbilden. Die Anzahl der Kolonien entspricht dabei der Mutationshäufigkeit am *hgprt*-Genlocus, die wiederum als Maß für das mutagene Potenzial des jeweils untersuchten (viralen) Proteins dient.

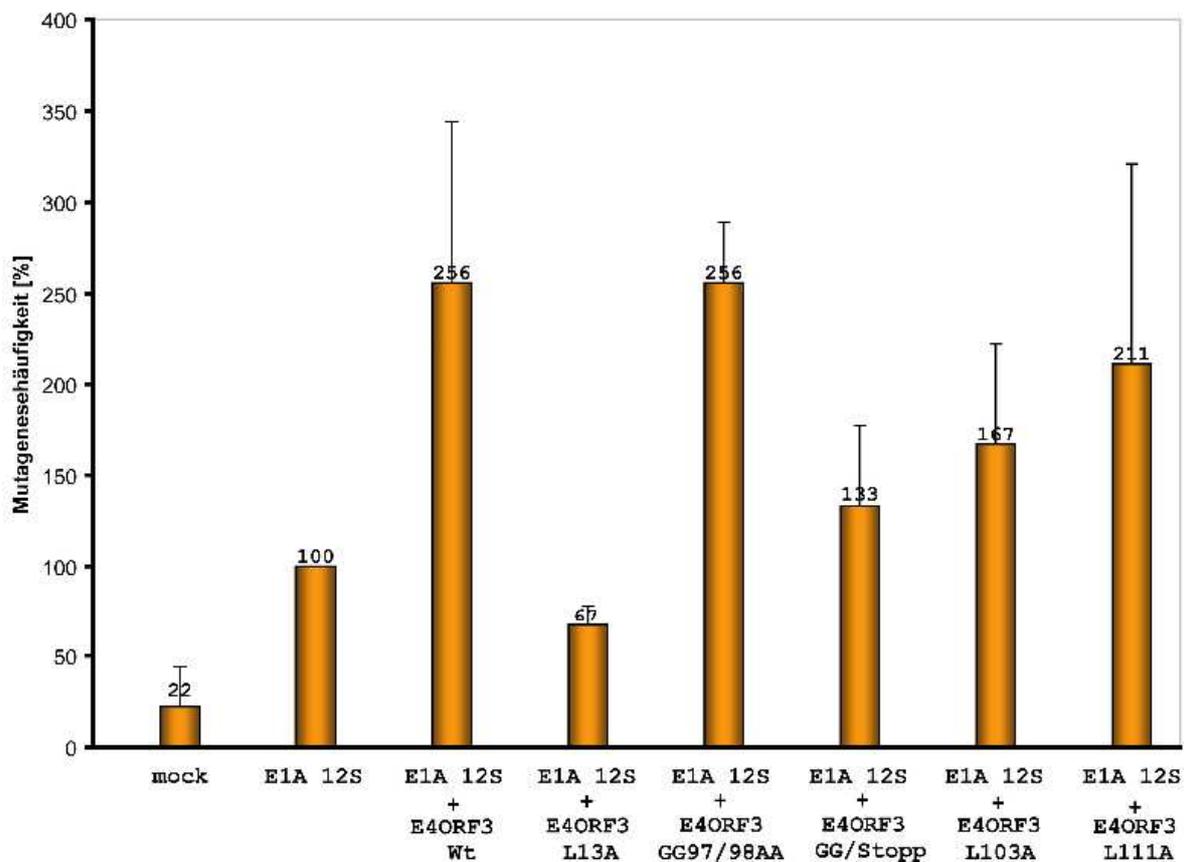


Abb.C.22: Mutagenes Potenzial verschiedener E4ORF3-Mutaten in Kooperation mit Ad E1A 12S

1×10^5 CHO-D422-Zellen wurden mit je $1,5 \mu\text{g}$ pCMV-E1A und $1,0 \mu\text{g}$ von je einem der folgenden Expressionskonstrukte pcDNA-HA, pcDNA-HA E4ORF3 Wt, pcDNA-HA E4ORF3 L13A, pcDNA-HA E4ORF3 GG97/98AA, pcDNA-HA E4ORF3 GG/Stopp, pcDNA-HA E4ORF3 L103A oder pcDNA-HA E4ORF3 L111A mittels der CaHPO_4 -Präzipitations-Methode transfiziert. Als Negativkontrolle dienten pcDNA3-HA-transfizierte ($2 \mu\text{g}$) CHO-D422-Zellen (mock). Nach vier Tagen wurden davon 1×10^5 Zellen pro 15cm-Schale ausgesät und in Selektivmedium mit 6-Thioguanin kultiviert. Nach weiteren acht Tagen wurden die resistenten Zellkolonien aus insgesamt 1×10^5 Zellen pro Ansatz nach dem Färben mit Kristallviolett ausgezählt. Dargestellt sind die auf E1A 12S-normierten Mutationshäufigkeiten unter Berücksichtigung der Plattierungseffizienzen und die dazugehörigen Standardabweichungen aus vier unabhängigen Versuchen ($n=4$).

Die Untersuchungen mit Hilfe dieses Testsystems zeigen, dass die transiente Expression von Ad5 E1A die Mutationshäufigkeit im *hgprt*-Gen deutlich erhöht. Im Vergleich zu E1A resul-

tiert die Koexpression von E1A und E4ORF3 in einer signifikanten Erhöhung der Anzahl resistenter Kolonien, was auf mutagene Eigenschaften des E4-Proteins in Verbindung mit E1A hinweist und frühere Ergebnisse bestätigt. Die alleinige Transfektion von Ad5 E4ORF3 verursacht keine mutagenen Effekte (Daten nicht gezeigt). Mutationen am Carboxyterminus (L103A, L111A) oder die Deletion dieses Bereiches (GG/Stop) führen zwar zu einer gesteigerten Mutationsfähigkeit im Vergleich zu E1A. Diese E4ORF3-Varianten zeigen jedoch deutlich geringere Mutationsraten als das Wildtyp-Protein. Demnach übt der Carboxyterminus von E4ORF3 zwar in Hinblick auf die Transformation einen überwiegend negativen, bei der Mutagenese jedoch einen positiven Effekt aus. Interessanterweise besitzt die E4ORF3-Variante GG97/98AA trotz eines geringen transformierenden ein mit E4ORF3 Wt vergleichbares mutagenes Potenzial. Die Ursache hierfür könnte darin liegen, dass E4ORF3 GG97/98AA im Vergleich zu den anderen untersuchten E4ORF3-Varianten zahlreiche Mutationen induziert, die für die meisten Zellen letal sind. Der Vergleich mit dem Wildtyp-Protein lässt allerdings vermuten, dass neben der Induktion von Mutationen noch weitere E4ORF3-Funktionen für eine effiziente Transformation erforderlich sind.

C.19 Zusammenfassung (III): E4ORF3 und die Transformation

Die molekularen Grundlagen für die Fähigkeit von E4ORF3, Zellen onkogen zu transformieren, sind nach wie vor unklar. Im Gegensatz dazu konnte das transformierende Potenzial von E4ORF6 mit der Modulation der Funktionen und der Stabilität von p53 in Verbindung gebracht werden. Da bislang kein solcher Einfluss von E4ORF3 auf p53 gezeigt werden konnte, wird vermutet, dass diese Effekte vor allem die Interaktion mit dem E1B-55kDa-Protein (König *et al.*, 1999; Leppard und Everett, 1999) und die E4ORF3-vermittelte Modulation von PML NBs (Carvalho *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996; Ishov und Maul, 1996) das transformierende Potenzial vermitteln. Die Tatsache jedoch, dass bisher keine Interaktion mit PML, dem Hauptbestandteil der PML NBs, nachgewiesen werden konnte (Nevels *et al.*, 1999b), legt die Vermutung nahe, dass andere PML NB-assoziierte Faktoren bei der Transformation eine wichtige Rolle spielen. Insbesondere Proteine, die an den zellulären Prozessen der DNA-Reparatur und der Zellzykluskontrolle beteiligt sind, stellen potenziell interessante Interaktionspartner dar.

Dies zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit. Demnach E4ORF3 ist in der Lage, an p300 und an den Tumorsuppressor p53 (evtl. indirekt) zu binden. Ebenso interessant ist die Tatsache, dass das E4-Protein durch die Interaktion auch die Aktivität von p300 (oder anderen HAT-Enzymen) und p53 modulieren kann. Gerade der Einfluss von E4ORF3 auf die Azetylierung von p53 und damit wahrscheinlich auch auf die p53-Funktionen könnte eine wichtige Rolle bei der Transformation spielen.

		Transformations-Test		Mutagenese-Test
		Ad5 E1-Region	Ad5 E1A 12S	Ad5 E1A 12S
mock		2%	9%	9%
E1 oder E1A 12S		76%	78%	39%
Ad5 E1 oder E1A 12S	Ad5 E4ORF3 Wt	100%	100%	100%
	Ad5 E4ORF3 L13A	52%	69%	26%
	Ad5 E4ORF3 GG97/98AA	43%	72%	100%
	Ad5 E4ORF3 GG/Stopp	155%	78%	52%
	Ad5 E4ORF3 L103A	83%	78%	65%
	Ad5 E4ORF3 L111A	99%	116%	82%

Tab.C.4: Ergebnisse aus den Transformations- und Mutagenese-Versuchen

Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden bei all diesen Experimenten die Werte von E4ORF3 Wt als Referenz verwendet und auf 100% normiert.

Frühere Studien konnten bereits eine Interaktion von E4ORF3 mit wichtigen zellulären DNA-Reparaturenzymen nachweisen (Boyer *et al.*, 1999; Stracker *et al.*, 2002; Evans und Hearing, 2005). Diese beobachteten Wechselwirkungen lassen die Vermutung zu, dass E4ORF3 durch die Modulation der Zellzykluskontrolle und DNA-Reparatur zur vermehrten Entstehung von Mutationen beiträgt.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mutationsanalysen zeigen jedoch, dass es keine direkte Korrelation zwischen der Mutationshäufigkeit und dem transformierenden Potenzial von E4ORF3 gibt. Vielmehr scheinen die verschiedenen E4ORF3-Varianten unterschiedliche Effekte auf die DNA-Reparatur und Kontrolle des Zellzyklus zu haben (Tab.C.4). Dies unterstreicht die Tatsache, dass nicht nur die Anhäufung von Mutationen, sondern auch die Deregulation zellulärer Prozesse, wichtige Voraussetzungen für die Transformation bilden.

C.20 Untersuchung ausgewählter Ad5 E4ORF3-Varianten im Kontext der Virusinfektion

C.20.1 Klonierungssystem zur gezielten Herstellung von Adenovirusvarianten

Da E4ORF3 eine Vielzahl von Funktionen während der viralen Infektion übernimmt, war es nun von großem Interesse, die Auswirkungen der verschiedenen Aminosäureaustausche im viralen Kontext zu untersuchen.

Der einzige Weg, sichere Daten im viralen Kontext zu erhalten, ist die Herstellung von Adenoviren, die die gewünschten Mutationen innerhalb der E4ORF3-Proteine tragen. Auf diese Weise können die stöchiometrischen Bedingungen innerhalb der Zelle exakt eingehalten werden. Ein Problem hierbei ist jedoch, dass die bislang etablierten Systeme (Chartier *et al.*, 1996; He *et al.*, 1998) zur Herstellung von Adenovirusmutanten die homologe Rekombination in Bakterienzellen benutzten. Gerade die Verwendung eines rekombinationskompetenten *E. coli*-Stammes führt aber oftmals zu unerwünschten Veränderungen innerhalb der DNA-Sequenz (z.B. Deletionen) und zieht ein zeit- und kostenintensives Überprüfen der erhaltenen Klone nach sich. Ein System zur Herstellung von gezielten Adenovirusmutanten sollte insbesondere zwei Voraussetzungen erfüllen: (i) es sollte schnell und einfach durchführbar sein und (ii) es sollte nicht auf die Benutzung von rekombinationskompetenten Bakterien angewiesen sein. Um dieses Ziel zu erreichen wurde in unserer Arbeitsgruppe ein neuartiges System etabliert (Groitl *et al.*, 2005). Dieses erlaubt nach der schnellen ortsgerichteten Mutagenese das direkte Klonieren der veränderten E4-Region in das 36 kB-große Genom von Ad5 (Abb.C.23).

Im ersten Schritt konnte nach Spaltung mit *Bst*BI aus dem Ad5-Bacmid die Ad5 E4-Region zusammen mit dem bakteriellen Vektoranteil gewonnen werden (pE4-Wt, 5,1 kB). Innerhalb der E4-Region (hier speziell *E4ORF3*) wurde dann die gewünschte Mutation mit Hilfe des *QuikChange*TM *Site-Directed Mutagenesis Kits* (STRATAGENE, Amsterdam, Niederlande) eingeführt (Oligonukleotide vgl. B.4.2). Dieser Umweg über pE4-Wt war notwendig, da eine direkte Mutagenese des Ad5-Bacmids aufgrund seiner Größe (36 kB) nicht möglich ist.

Danach erfolgte die Rückklonierung des modifizierten pE4-Wt (pE4-Variante) über *Bst*BI in das Ad5-Bacmid. Als Ergebnis lag nun ein Ad5-Bacmid mit verändertem *E4ORF3*-Gen vor (Abb.C.23). Im Anschluss daran wurde das Bacmid mit *Pac*I linearisiert, um den bakteriellen Plasmidanteil zu entfernen. Schließlich wurden E1-transformierten 911-Zellen mit der

linearen, doppelsträngigen Virus-DNA transfiziert und die daraus entstanden Adenovirusmutanten wie unter Kapitel B.10.2 beschrieben gerntet (Abb.C.24).

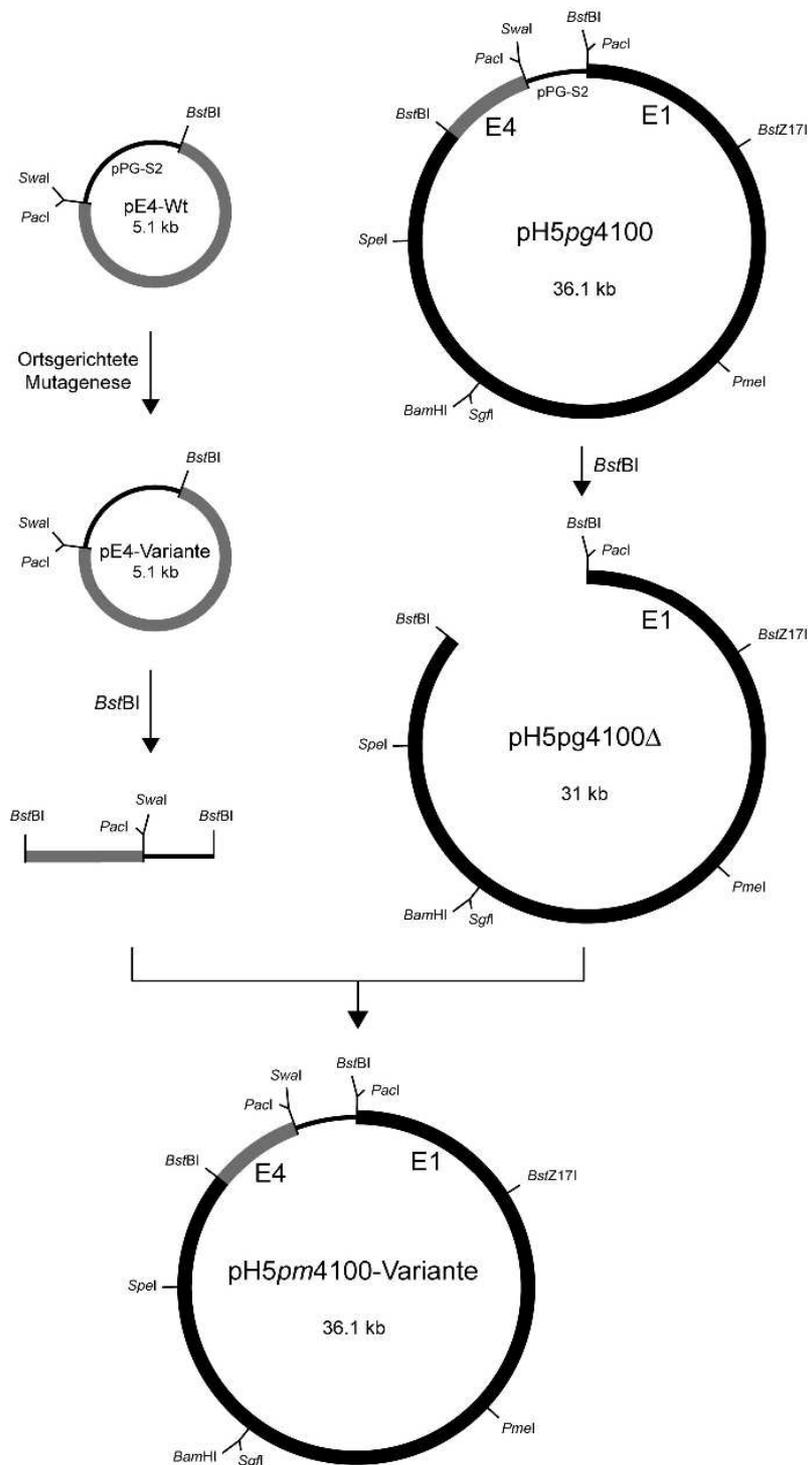


Abb.C.23: Schematische Darstellung der Herstellung von modifizierten Ad5-Bacmiden

In die E4-Region innerhalb von pE4-Wt wurde mittels ortsgerechter Mutagenese eine Punktmutation eingeführt. Im Anschluss daran erfolgt die Klonierung des modifizierten pE4-Wt (pE4-Variante) über *BstBI* in das Ad5-Bacmid (pH5pg4100Δ). Mit Hilfe des daraus entstehenden Bacmids pH5pm4100-Variante konnten schließlich die gewünschten Virusmutanten hergestellt werden.

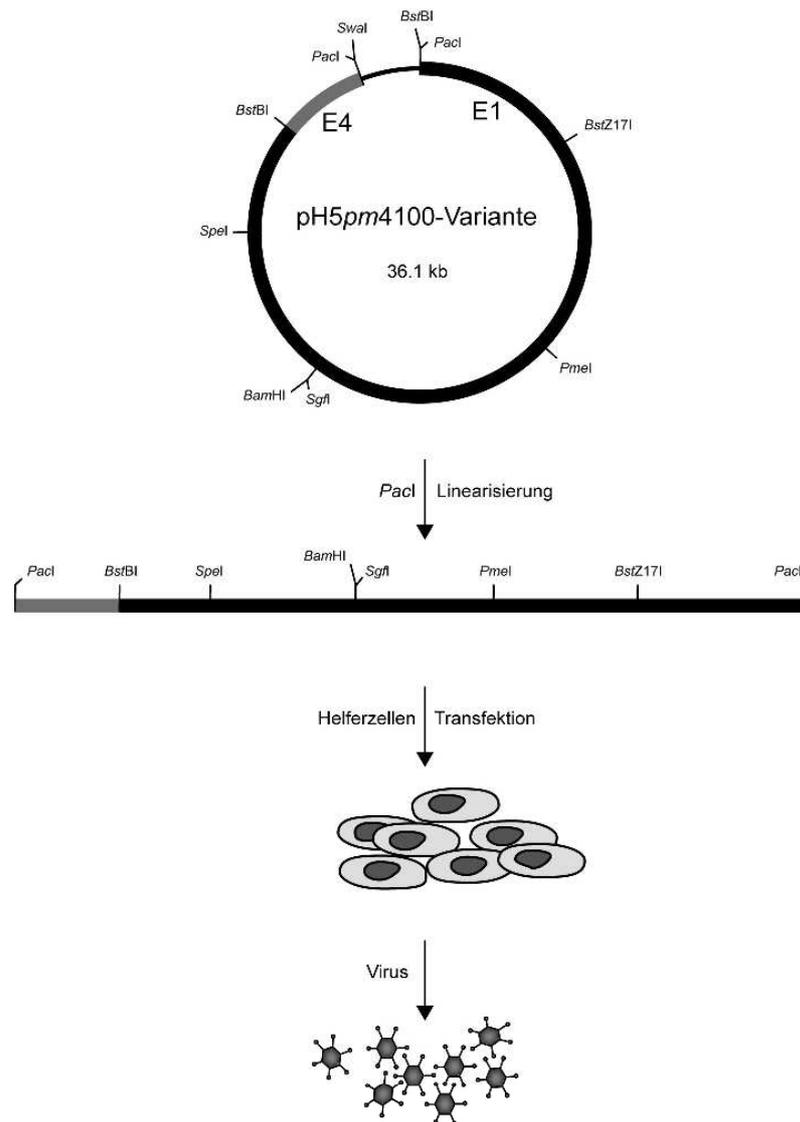


Abb.C.24: Schematische Darstellung der Herstellung von Ad5-Virusmutanten

Zur Gewinnung von Adenoviren aus Bacmid-DNA wurden 911-Zellen, nach Linearisierung des Bacmids (pH5pm4100-Variante) mit *PacI*, mit Hilfe der CaHPO_4 -Präzipitations-Methode transfiziert. Nach wenigen Tagen konnte aus diesen Zellen schließlich infektiöse Viruspartikel isoliert werden, und die Adenoviren durch wiederholte Reinfektionen von 911-Zellen weiter vermehrt werden.

C.20.2 Charakterisierung der Ad5 E4ORF3-Virusmutanten

Nach der Herstellung verschiedener E4ORF3-Virusmutanten sollte zunächst untersucht werden, welchen Einfluss die Mutationen innerhalb der E4ORF3-Region auf die Gleichgewichtsmengen der entsprechenden E4ORF3-Polypeptide im Verlauf der Infektion haben. Dazu wurden die beiden humanen Zelllinien A549 und HeLa wie unter B.10.5 beschrieben mit 5 ffu (*fluorescent forming units*, Fluoreszenz-bildende Einheiten) pro Zelle infiziert, zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet, mit RIPA-Puffer aufgeschlossen (B.11) und mit Hilfe der

Western Blot-Methode (B.14) analysiert. Da die Ergebnisse beider Zelllinien nahezu identisch waren, wurden nur die Resultate für HeLa-Zellen in dieser Arbeit dargestellt (Abb.C.25).

Demzufolge kann man das E4ORF3-Wildtyp-Protein, das als frühes Protein bereits 7 h nach Infektion von HeLa-Zellen mit Wildtyp-Virus exprimiert wird (König *et al.*, 1999), beim Zeitpunkt 24 h nachweisen (Abb.C.25). Die Mengen an E4ORF3 nehmen im weiteren Verlauf der Infektion dabei nur noch leicht zu (Abb.C.25: Spur 2 bis 5). Bei Virusmutanten, die Mutationen am Carboxyterminus von E4ORF3 tragen, sind die entsprechenden E4ORF3-Proteine dagegen erst wesentlich später detektierbar. So sind die E4ORF3-Varianten L103A und L111A erst 48 h nach Infektion in nachweisbaren Mengen vorhanden (Abb.C.25: Spur 29). Dennoch weisen diese beiden carboxyterminalen Virusmutanten untereinander signifikante Unterschiede in den E4ORF3-Gleichgewichtsmengen auf. L111A liegt 48 h und 72 h nach Infektion im Gegensatz zu L103A in um ein Vielfaches größeren Mengen vor. Interessanterweise sind die E4ORF3-Mengen der Virusmutante L111A im Vergleich zu Ad5 Wt nach 72 h mindestens um den Faktor 10 höher (Abb.C.25: Spur 30), obwohl die Expression von E4ORF3 L111A erst wesentlich später als bei E4ORF3 Wt einsetzt. In diesem Zusammenhang zeigt sich bei dieser Mutante ab 48 h ein dramatischer Anstieg der E4ORF3-Menge, während die Zunahme der Gleichgewichtsmengen von E4ORF3 Wt in diesem Zeitfenster wesentlich langsamer von statten geht (Abb.C.25: Spur 4 und 5).

Analog zu den Transfektionsexperimenten in H1299- und BRK1-Zellen, in denen E4ORF3 GG/Stopp kaum nachweisbar ist, zeigt auch die korrespondierende Virusmutante im gesamten Verlauf der Infektion Gleichgewichtsmengen, die unter der Nachweisgrenze liegen (Abb.C.25: Spur 19 bis 22). Auch die E4ORF3-Proteine der Virusmutanten K8R und GG97/98AA sind im viralen Kontext nicht detektierbar (Abb.C.25: Spur 6 bis 9 und Spur 10 bis 13). Doch im Gegensatz zu GG/Stopp waren die entsprechenden E4ORF3-Proteine in der transienter Expression in ausreichenden Mengen vorhanden. Interessanterweise führen gezielte Aminoäureaustausche innerhalb der E4ORF3-Region im Gegensatz zu den Transfektionsexperimenten zu stark reduzierten E4ORF3-Gleichgewichtsmengen während der Virusinfektion. Als Kontrolle wurde die Insertionsmutante E4inORF3 verwendet. Diese Virusmutante kann aufgrund einer Insertion am Aminoterminal von E4ORF3 kein E4ORF3 mehr herstellen. Dennoch zeigt sie im Hinblick auf die virale DNA-Replikation, die Synthese später viraler Proteine, das Abschalten der zellulären Proteinsynthese (*host shutoff*) und die Produktion von Nachkommenviren keinen Defekt im Vergleich zu Ad5 Wt (Huang und Hearing, 1989).

Insgesamt zeigen diese Versuche, dass die Einführung von Mutationen innerhalb der E4ORF3-Region im viralen Kontext stärkere Auswirkungen auf die Gleichgewichtsmengen von E4ORF3 haben als in Transfektionsexperimenten. Dementsprechend gibt es Virusmutanten (K8R, GG97/98AA, GG/Stopp) deren E4ORF3-Gleichgewichtsmengen unter der Nachweisgrenze liegen. Ganz anders verhält sich die Virusmutante L111A, bei der eine deutliche Steigerung der E4ORF3-Mengen im Vergleich zum Wildtyp-Protein zu beobachten ist.

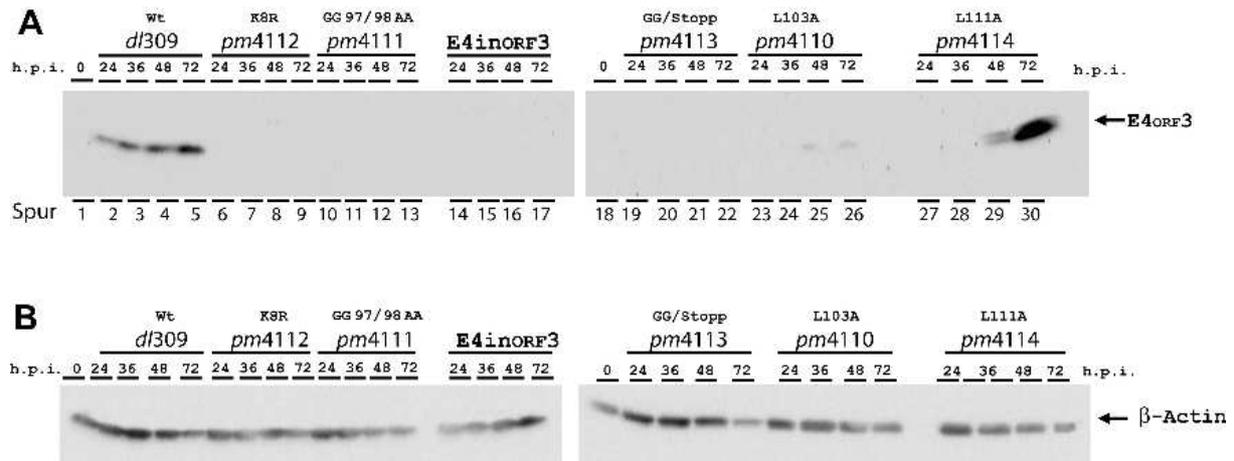


Abb.C.25: Synthese verschiedener E4ORF3-Proteine im Verlauf der Infektion in HeLa-Zellen

2×10^6 HeLa-Zellen wurden mit Wt- und verschiedenen E4ORF3-Adenovirusmutanten mit 5 ffu pro Zelle infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten 24, 36, 48 und 72 h nach Infektion (h.p.i.) geerntet. Nicht infizierte Zellen dienen als Negativkontrolle (0 h.p.i.). Nach Auftrennung von 100 μ g Gesamtprotein über ein denaturierendes 15%iges SDS-Polyacrylamidgel wurde (A) E4ORF3 mit Hilfe des E4ORF3-spezifischen Antikörpers 6A11 detektiert. Der Nachweis von (B) β -Actin erfolgte mit dem spezifischen β -Actin-Antikörper (SIGMA, München) und diente als Ladekontrolle.

C.20.3 Lokalisation von E4ORF3 in infizierten A549-Zellen

Aufgrund der Tatsache, dass die Strukturen der untersuchten E4ORF3-Varianten in transfizierten Zellen teilweise von den charakteristischen, elongierten Formen im Zellkern abweichen, sollte nun im viralen Kontext überprüft werden, welchen Einfluss die eingeführten Mutationen auf die Lokalisation von E4ORF3 innerhalb der Zelle haben. Zudem sollte untersucht werden, ob das jeweilige E4ORF3-Protein der Virusmutanten, das mittels *Western Blot*-Analyse nicht nachgewiesen werden konnte, generell hergestellt wird (Abb.C.25).

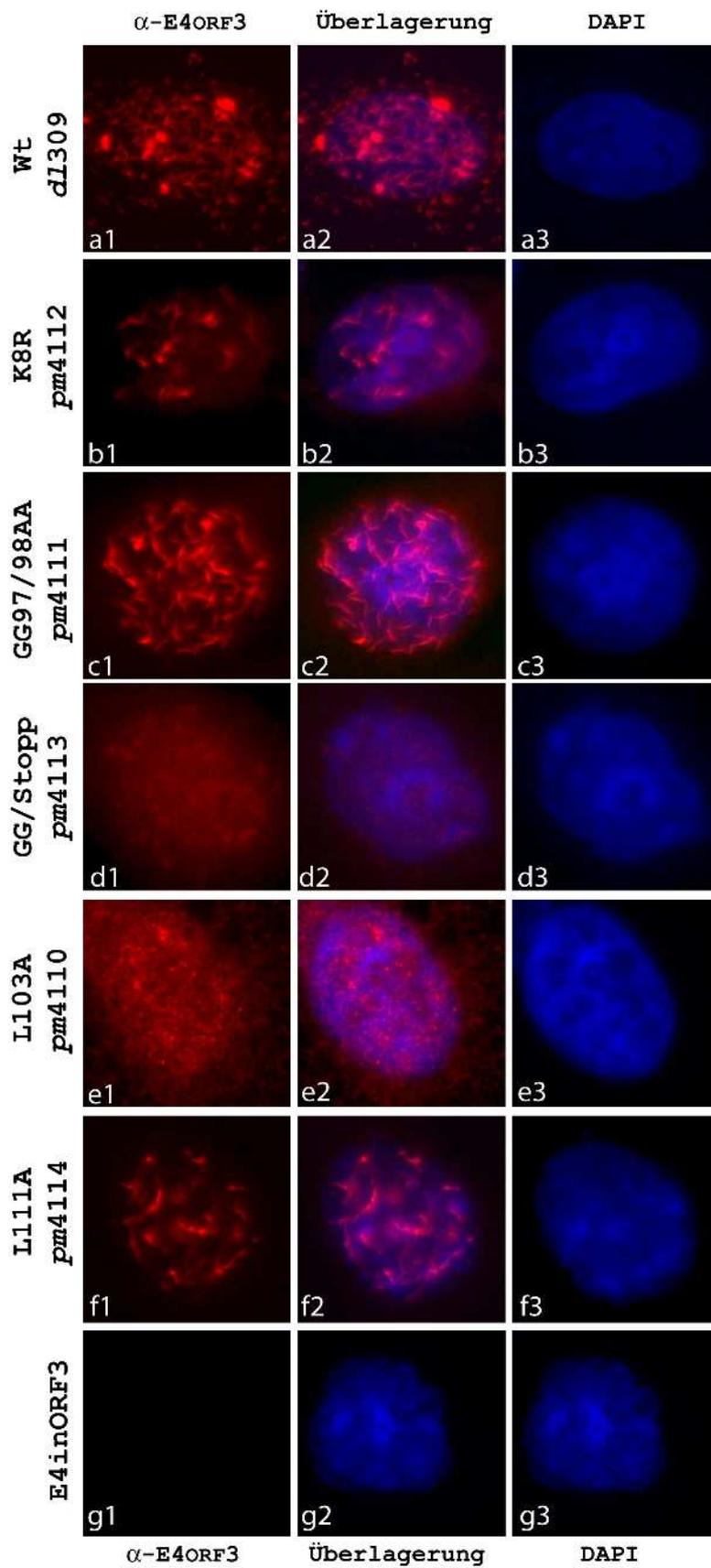
Zu diesem Zweck wurden Immunfluoreszenz-Analysen in Adenovirus-infizierten A549-Zellen durchgeführt (Abb.C.26). Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass im Gegensatz zu E4inORF3 alle untersuchten Virusmutanten in der Lage sind, E4ORF3 grundsätzlich zu exprimieren. Die dort beobachteten E4ORF3-Strukturen sind zudem wesentlich einheitlicher als nach der Transfektion. E4ORF3-Wt und die Variante K8R bilden auch während der

Infektion die bekannten, fadenartigen Strukturen aus (Abb.C.26: Bild a1 und b1). Doch im Gegensatz zu den Transfektionsexperimenten in H1299-Zellen ist sowohl bei dem Wildtyp-Protein als auch bei K8R eine deutliche Reduktion der zytoplasmatischen Aggregate und PNBs zu beobachten (Abb.C.26: Bild a2 und b2). Dennoch ist E4ORF3 Wt gehäuft im Zytoplasma vorzufinden, jedoch nicht in Form von Aggregaten, sondern in elongierten Strukturen. Zusätzlich bewirkt die Mutation des einzigen Lysinrestes (K8R) eine signifikante Verringerung der E4ORF3-Mengen im Zellkern und im Zytoplasma (Abb.C.26: Bild b2), die sich auch in den stark reduzierten Gleichgewichtsmengen widerspiegelt (Abb.C.25). Die E4ORF3-Variante L111A ist ebenso wie das Wildtyp-Protein in der Lage, fadenartige Strukturen zu bilden (Abb.C.26: Bild f1), obwohl L111A in allen bisherigen Transfektionen ein eher grobkörniges Verteilungsmuster im Zellkern zeigte. Dagegen weisen die Mutanten GG97/98AA, GG/Stopp und L103A keine wesentlichen Unterschiede zwischen Infektionen und Transfektionen auf (Abb.C.26: Bild c1, d1 und e1). Denn auch im viralen Kontext zeigt GG97/98AA punktförmige Strukturen im Zellkern (Abb.C.26: Bild c2), während GG/Stopp und L103A durch eine hauptsächlich diffuse Verteilung gekennzeichnet sind (Abb.C.26: Bild d2 und e2).

Zusammenfassend machen diese Versuche deutlich (Abb.C.26), dass gezielte Austausche innerhalb der E4ORF3-Aminosäuresequenz auch im viralen Kontext vor allem Auswirkungen auf die Ausbildung bestimmter nukleärer und/oder zytoplasmatischer Strukturen, aber auch auf die Lokalisation des E4ORF3-Proteins innerhalb der Zelle haben. Genauer betrachtet ergeben die Analysen, dass in Adenovirus-infizierten Säugerzellen (i) E4ORF3 grundsätzlich hergestellt wird, dass im Vergleich zur Transfektion (ii) eine deutliche Abnahme von zytoplasmatischen Aggregaten zu beobachten ist, dass (iii) stattdessen elongierte E4ORF3-Strukturen vermehrt im Zytoplasma vorkommen und dass (iv) die Ausbildung von E4ORF3-Strukturen in direkter oder indirekter Weise von weiteren adenoviralen Proteinen oder von Virus-modifizierten zellulären Faktoren beeinflusst wird.

Abb.C.26 (siehe S. 118): Immunfluoreszenz-Analysen zur Lokalisation von E4ORF3 in A549

2×10^6 A549-Zellen wurden mit Wt- und verschiedenen E4ORF3-Adenovirusmutanten mit 20 ffu pro Zelle infiziert und 24 h nach Infektion mit Methanol fixiert. Nicht infizierte Zellen dienten als Negativkontrolle (mock). Der Nachweis von E4ORF3 erfolgte mit Hilfe des E4ORF3-spezifischen Antikörpers 6A11 (a1 bis g1). Zum besseren Erkennen des Zellkerns wurde die DNA mit DAPI angefärbt (a3 bis g3). Die Überlagerung der E4ORF3- und DAPI-Färbung ist in a2 bis g2 dargestellt. Alle Aufnahmen wurden mit 1.000-facher Vergrößerung aufgenommen.



C.20.4 Einfluss von PML NB-Komponenten auf die E4ORF3-Strukturen in infizierten MEF-Zellen

Die Tatsache, dass während der frühen Phase der Virusreplikation E4ORF3 für die Modulation der PML NBs benötigt wird (Carvalho *et al.*, 1995; Puvion-Dutilleul *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996), legt die Vermutung nahe, dass PML im Umkehrschluss für die Organisation der E4ORF3-Strukturen verantwortlich ist. Da in den Transfektionsexperimenten dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass nicht PML und PML NBs, sondern p300 die Ausbildung der typischen E4ORF3-Strukturen vermittelt, sollte diese Beobachtung auch im viralen Kontext betrachtet und überprüft werden.

Dazu wurden PML- und p300-negative sowie Wildtyp MEF-Zellen mit verschiedenen Adenovirusvarianten mit 150 ffu pro Zelle infiziert und nach 24 h mit Methanol fixiert (Abb.C.27). Das Ergebnis zeigt, dass in Wildtyp-MEF-Zellen (Abb.C.27A) E4ORF3 Wt ausgeprägte zytoplasmatische Aggregate und PNBs bildet (Abb.C.27A: Bild b1), während es im Zellkern zusammen mit PML in fadenartigen Strukturen vorliegt (Abb.C.27A: Bild b3). In PML-negativen Zellen (Abb.C.27B) ist jedoch eine Reduktion dieser zytoplasmatischen Aggregate zu beobachten und E4ORF3 Wt kommt im Zellkern sowohl in punktförmigen, aber auch in elongierten Formen vor (Abb.C.27B: Bild b1 und b3). Fehlt jedoch p300 (Abb.C.27C), so bildet E4ORF3 sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma punktförmige Strukturen aus. Doch im Gegensatz zur Transfektion (Abb.C.15) ist in Abwesenheit von p300 keine überwiegend zytoplasmatische Verteilung von E4ORF3 zu beobachten (Abb.C.27C: Bild c3). Die in diesem Zusammenhang gemachte Annahme, dass p300 allein für die hauptsächlich nukleäre Lokalisation von E4ORF3 erforderlich ist, gilt daher nicht im viralen Kontext. Andere adenovirale Proteine könnten stattdessen zur Retention von E4ORF3 im Zellkern beitragen.

Zusammen mit den Ergebnissen aus der Transfektion ergibt sich folgendes Bild. So spielt PML eine wesentliche Rolle bei der Akkumulation von E4ORF3 in zytoplasmatischen Aggregaten und/oder PNBs. Dagegen sorgen womöglich neben p300 auch andere, virale Faktoren für eine nukleäre Retention von E4ORF3 während der Virusinfektion. Wahrscheinlich ist diese nukleäre Lokalisation von E4ORF3 in der Folge für die Ausbildung der charakteristischen elongierten E4ORF3-Strukturen im Zellkern verantwortlich. Die Entstehung dieser Strukturen ist vermutlich allein abhängig von p300, wie die Transfektionsexperimente dieser Arbeit (Abb.C.15) belegen. Die Ergebnisse dort zeigen, dass in p300-negativen MEF-Zellen nach Koexpression von p300 statt punktförmiger wieder elongierte E4ORF3-Strukturen gebildet werden.

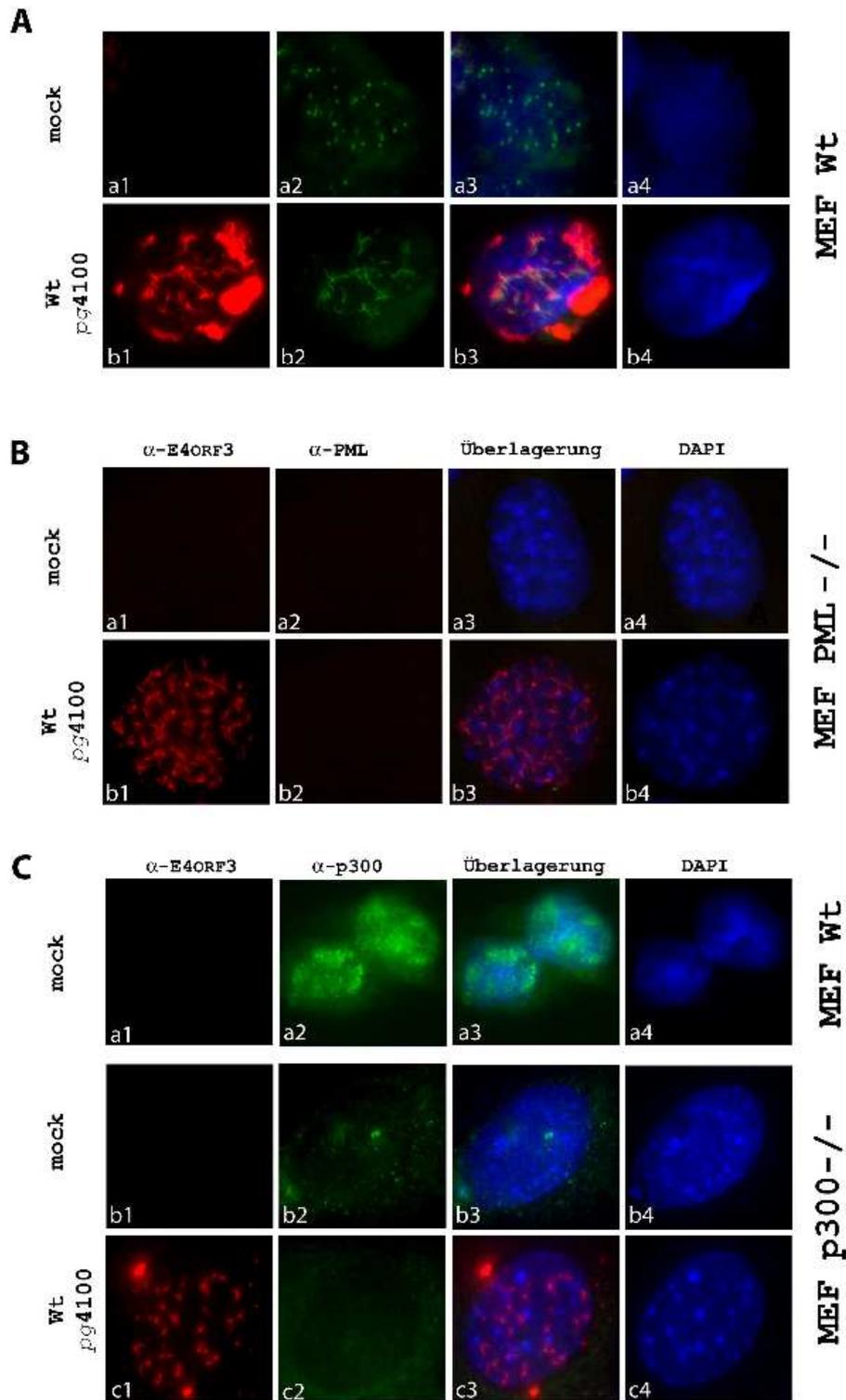


Abb.C.27. Einfluss von PML und p300 auf die Lokalisation von E4ORF3 in infizierten MEF

2×10^6 MEF-Zellen wurden mit Ad5 Wt mit 150 ffu pro Zelle infiziert, fixiert. Nicht infizierte Zellen dienen als Negativkontrolle (mock). Die MEF Wt-Zellen (A), die PML^{-/-} MEF-Zellen (B) und die p300^{-/-} MEF-Zellen (C) wurden 24 h nach Infektion mit Methanol fixiert. Der Nachweis von E4ORF3 erfolgte mit Hilfe des E4ORF3-spezifischen Antikörpers 6A11 (a1 bis c1). Zur Detektion der jeweiligen PML NB-Komponenten wurden der PML-spezifische Antikörper 5E10 (A und B: a2 und b2) bzw. der p300-spezifische Antikörper C20 (C: a2 bis c2) verwendet. Zum besseren Erkennen des Zellkerns wurde die DNA mit DAPI (a4 bis c4) angefärbt. Die Überlagerung der E4ORF3-, der PML- bzw. p300- sowie der DAPI-Färbung sind in den Bildern a4 bis c4 dargestellt. Alle Aufnahmen wurden mit 1.000-facher Vergrößerung aufgenommen.

C.21 Zusammenfassung (IV): E4ORF3 im viralen Kontext

Die Analyse spezifischer E4ORF3-Funktionen im viralen Kontext gestaltet sich äußerst schwierig. Denn E4ORF3-Deletionsvirusmutanten zeigen in der Zellkultur nach Infektion mit geringen Virusmengen keine Phänotypen, die auf das Fehlen von E4ORF3 zurückzuführen sind. Grund hierfür sind die redundanten Funktionen verschiedener früher adenoviraler Proteine während der Infektion. Neben dem E4-Protein E4ORF6 können auch einzelne Genprodukte der E1-Region einige der lytischen E4ORF3-Funktionen übernehmen.

Dennoch bestand ein wesentliches Ziel dieser Arbeit zunächst darin, mit Hilfe eines in unserer Arbeitsgruppe neu entwickelten Klonierungssystems gezielt Mutationen innerhalb der E4ORF3-Region einzuführen. Die Analyse dieser Virusmutanten hinsichtlich ihrer E4ORF3-Gleichgewichtsmengen und der Lokalisation des entsprechenden E4ORF3-Proteins sollten einen weiteren Hinweis über die genaue Funktion von E4ORF3 im viralen Kontext geben und die Grundlagen für weitere Untersuchungen bilden.

Zusammen mit den Ergebnissen früherer Arbeiten unserer Arbeitsgruppe ergibt sich dabei folgendes Bild. Demzufolge

- ist das neuartige Klonierungssystem hervorragend geeignet für die Herstellung ausgewählter E4ORF3-Virusmutanten (Groitl *et al.*, 2005).
- können einige der entsprechenden E4ORF3-Proteine (z.B.: K8R, L103A) zwar nach transienter Transfektion, jedoch nicht in der Virusinfektion nachgewiesen werden.
- haben andere adenovirale Faktoren möglicherweise einen Einfluss auf die E4ORF3-Gleichgewichtsmengen.
- bilden die entsprechend untersuchten E4ORF3-Virusmutanten im Gegensatz zur Transfektion wesentlich einheitlichere E4ORF3-Strukturen im Zellkern aus.
- ist im Vergleich zur transienten Transfektion eine deutliche Abnahme von E4ORF3-Aggregaten und gleichzeitig eine signifikante Zunahme an elongierten E4ORF3-Strukturen im Zytoplasma erkennbar.
- zeigt sich, dass die nukleäre Retention des E4ORF3-Proteins nicht allein von p300, sondern auch von möglichen adenoviralen Interaktionspartnern abhängig ist.
- ist aber p300 allein für die Ausbildung elongierter E4ORF3-Strukturen verantwortlich.

D Diskussion

Bereits 1982 gelang es Levine und Kollegen, in Adenovirus-infizierten HeLa-Zellen ein 11 kDa-Protein aus der nukleären Matrix zu isolieren und E4ORF3 als Genprodukt der frühen E4-Region des offenen Leserahmens 3 zu identifizieren (Sarnow *et al.*, 1982). Mehr als 20 Jahre danach ist allgemein anerkannt, dass E4ORF3 ebenso wie ein weiteres Genprodukt der frühen E4-Region E4ORF6 für die Virusreplikation von besonderer Bedeutung ist (Bridge und Ketner, 1989; Huang und Hearing, 1989). Das Fehlen beider früherer E4-Proteine hat zwar keinen Einfluss auf die Expression früherer viraler Faktoren, führt jedoch zu offensichtlichen Defekten während der viralen DNA-Replikation (Halbert *et al.*, 1985; Weinberg und Ketner, 1986). Beide E4-Proteine besitzen dabei kompensatorische Funktionen und können unabhängig voneinander die virale DNA-Replikation sowie die späte virale Proteinsynthese erhöhen, das Abschalten der zellulären Proteinsynthese vermitteln (*host shutoff*), die Produktion von Nachkommenviren steigern und die Konkatemersierung von adenoviralen Genomen verhindern (Halbert *et al.*, 1985; Bridge und Ketner, 1989, 1990; Huang und Hearing, 1989a; Weiden und Ginsberg, 1994).

Die redundanten Funktionen beider E4-Proteine während der lytischen Infektion werden vor allem ihrer Fähigkeit zugeschrieben, mit denselben zellulären und viralen Proteinen zu interagieren. So können sowohl E4ORF3 als auch E4ORF6 an das adenovirale E1B-55kDa-Produkt binden (Leppard und Everett, 1999; Nevels *et al.*, 1999b), das als multifunktionaler Regulator der Zellzyklus-unabhängigen Adenovirus-Replikation verschiedene Prozesse steuert, wie beispielsweise die Inhibierung der p53-abhängigen Apoptose und des G₁/S-Phasen-Überganges sowie des selektiven nukleozytoplasmatischen Transports von viralen und zellulären mRNA-Transkripten (zur Übersicht: Dobner und Kzhyshkowska, 2001). Beide E4-Proteine bedingen dadurch eine nukleäre Retention von E1B-55kDa und sequestrieren das E1B-Protein in verschiedene Virus-induzierte Strukturen im Zellkern (Ornelles und Shenk, 1991; Goodrum *et al.*, 1996; König *et al.*, 1999; Leppard und Everett, 1999).

Der Mre11-Rad50-NBS1 (MRN)-Komplex sowie die DNA-abhängige Protein-Kinase DNA PK übernehmen Schlüsselpositionen bei der Detektion und Reparatur von DNA-

Doppelstrangbrüchen (Boyer *et al.*, 1999; D'Amours und Jackson, 2002; Stracker *et al.*, 2002). Die Aufgabe von E4ORF3 und E4ORF6 besteht darin, die Konkatemerisierung der linearen, doppelsträngigen DNA-Genome durch das zelluläre DNA-Reparatursystem zu verhindern (Boyer *et al.*, 1999; Stracker *et al.*, 2002; Weiden und Ginsberg, 1994) und dadurch die virale DNA-Replikation zu gewährleisten. Die beiden E4-Proteine interagieren dabei unabhängig voneinander mit der katalytischen Untereinheit von DNA PK (Boyer *et al.*, 1999). E4ORF6 bewirkt darüber hinaus im Komplex mit E1B-55kDa den Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Abbau des Tumorsuppressors p53 und Mre11. Die Expression von E4ORF3 dagegen beeinflusst die subnukleäre Lokalisation der MRN-Komponenten (Stracker *et al.*, 2002). Evans und Hearing konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die E4ORF3-induzierte Reorganisation dieser Komponenten während der frühen Phase der Virusinfektion für eine effiziente virale DNA-Replikation benötigt wird (Evans und Hearing, 2005).

Neben dem zellulären MRN-Komplex stellen auch die nukleären PML NBs und/oder ihre Komponenten wichtige Zielstrukturen von E4ORF3 dar. Es scheint, dass während der frühen Phase der Adenovirusinfektion E4ORF3 allein für die Reorganisation der PML NBs in fadenartige Strukturen, die in unmittelbarer Nähe der adenoviralen DNA-Replikationszentren lokalisiert sind, verantwortlich ist (Carvalho *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996). In der Zwischenzeit mehren sich die Hinweise, dass die Umstrukturierung der PML NBs eng mit der Modulation der (intra)zellulären Immunantwort und der Zellzyklus-unabhängigen Virusvermehrung gekoppelt ist (Goodrum und Ornelles, 1999; Shepard und Ornelles, 2004). Die genaue Funktion dieser subzellulären Multiproteinkomplexe ist bislang allerdings noch unklar, doch werden PML NBs mit einer Vielzahl verschiedener zellulärer Vorgänge, wie der Regulation der Transkription, der Wachstumskontrolle, der Antwort auf DNA-Schäden, Apoptose und zellulären Abwehrmechanismen, in Verbindung gebracht (Negorev und Maul, 2001; Borden, 2002; Hofmann und Will, 2003).

D.1 PML-unabhängige Funktionen von E4ORF3

Infektionen mit Adenovirus Typ5 führen bereits in der frühen Phase der lytischen Infektion zu einer Modulation der PML NBs (Carvalho *et al.*, 1995; Puvion-Dutilleul *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996). Obwohl es anerkannte wissenschaftliche Meinung ist, dass E4ORF3 allein für diese Reorganisation verantwortlich ist (Carvalho *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996; Ishov und

Maul, 1996), sind die molekularen Mechanismen für die E4ORF3-vermittelten Veränderungen in der nukleären Architektur sowie die Konsequenzen, die sich aus dieser Umstrukturierung von zellulären Faktoren ergeben, nach wie vor unklar. Im viralen Kontext scheint die E4ORF3-induzierte Reorganisation dieser Strukturen PML NB-assoziierten Komponenten für E1B-55kDa und E4ORF6 besser zugänglich zu machen. Dies führt wahrscheinlich zu einer gesteigerten, Zellzyklus-unabhängigen Replikation oder zu einem verbesserten Virus-vermittelten Transport viraler RNA-Transkripte (Goodrum und Ornelles, 1999; Sheppard und Ornelles, 2003). Die Tatsache, dass viele virale Replikationszentren in nächster Nähe der PML NBs zu finden sind, unterstreicht die Annahme, dass PML NBs ein wichtiges Reservoir unterschiedlicher zellulärer Faktoren darstellen, die für die Virusvermehrung von großer Bedeutung sind (zur Übersicht: Everett, 2001; Everett *et al.*, 2003; Everett und Murray, 2005).

Darüber hinaus gibt es zahlreiche Hinweise, dass PML und insbesondere die PML NBs an der Abwehr von Virusinfektionen beteiligt sind (zur Übersicht: Everett, 2001; Regad und Chelbi-Alix, 2001). Dies könnte eine Ursache dafür sein, dass diese subzellulären Strukturen häufig Ziele von regulatorischen, viralen Proteinen von DNA- und RNA-Viren (Debois *et al.*, 1996; Doucas und Evans, 1996; Day *et al.*, 1998; Doucas und Evans, 1999) sind und durch diese moduliert und/oder zerstört werden.

Um nun den Einfluss von E4ORF3 auf die Reorganisation der PML NBs zu untersuchen, wurde in PML-negativen Mausembryofibroblasten (MEF)-Zellen das E4ORF3-Wildtyp-Protein transient exprimiert. Mit Hilfe dieses Experimentes konnte gezeigt werden, dass PML nicht das eigentliche Zielprotein darstellt, da auch in dessen Abwesenheit E4ORF3 die typischen fadenförmigen Strukturen ausbilden kann. Dies bestätigen frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, bei denen in transformierten Rattenzellen keine physikalische Interaktion zwischen PML und E4ORF3 nachgewiesen werden konnte (Nevels *et al.*, 1999b). Darüber hinaus ist E4ORF3 nicht in der Lage, die Gleichgewichtsmengen verschiedener über-exprimierten PML-Isoformen zu beeinflussen (C.9; Abb.C.10), wie es bereits in der Adenovirusinfektion gezeigt werden konnte (Leppard und Everett, 1999). Es hat den Anschein, dass E4ORF3 durch die direkte Interaktion mit anderen Komponenten der PML NBs die Modulation dieser nukleären Domänen vermittelt. Dafür ist im Wesentlichen der Carboxy-terminus seitens des E4ORF3-Proteins verantwortlich, wie die Mutationsanalysen in BRK1-Zellen verdeutlichen (C.7). Aminosäureaustausche in dieser Region von E4ORF3 verhindern zwar die Reorganisation von PML NBs, haben aber in der Regel weder einen Einfluss auf die Ausbildung E4ORF3-typischer Strukturen noch auf die Kolokalisation mit PML NBs. Lediglich Mutationen von Asparagin⁸² und Leucin¹⁰³ in E4ORF3 heben diese Kolokalisation auf und

führen zu einer diffusen Verteilung des viralen Proteins im Zellkern bzw. im Zytoplasma (Abb.C.8). Es handelt sich deshalb nicht um PML, sondern um andere PML NB-assoziierten Proteine, die das eigentliche Ziel für E4ORF3 darstellen. Diese zellulären Faktoren können dabei über die Bindung an E4ORF3 über dessen Aminosäuren an Position 82 und L103 nicht nur die Assoziation mit den PML NBs, sondern auch die Modulation dieser nukleären Strukturen hervorrufen. Im Gegensatz dazu verhindert die Deletion des Carboxyterminus von E4ORF3 (GG/Stopp) die Entstehung elongierter E4ORF3-Strukturen und bewirkt, dass das virale Protein sowohl punktförmig als auch diffus im Zellkern vorliegt. Dennoch kann hier eine Kolokalisation mit den PML NBs beobachtet werden. Dies verdeutlicht, dass diese beiden Funktionen des viralen E4-Proteins – Umstrukturierung und Kolokalisation – getrennt voneinander betrachtet werden müssen. Möglicherweise ist dies auf die Interaktion zwischen verschiedenen zellulären Faktoren und limitierten Mengen an E4ORF3 zurückzuführen. Abhängig von dem jeweiligen Bindungspartner übt das virale Protein dann möglicherweise unterschiedliche Funktionen aus.

D.2 Interaktion von E4ORF3 und p300 *in vivo*

Auf der Suche nach weiteren zellulären Interaktionspartnern von E4ORF3 konnte in unserer Arbeitsgruppe das PML NB-assoziierte Protein p300 identifiziert werden (Täuber, 2002). Zusammen mit CBP gehört p300 zu einer Familie zellulärer Transkriptionskofaktoren, die einer Vielzahl verschiedener zellulärer Transkriptionsfaktoren, wie den Steroid-Hormonrezeptoren (Kamei *et al.*, 1996), c-Jun (Bannister *et al.*, 1995), Fos (Bannister und Kouzarides, 1995), p53 (Avantaggiati *et al.*, 1997; Lill *et al.*, 1997a; Gu *et al.*, 1997) und NFκB (Merika *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998) als Plattformen dienen und dadurch Interaktionen zwischen diesen Transkriptionsfaktoren und den Komponenten des basalen Transkriptionsapparates ermöglichen. Beide Proteine vermitteln als Antwort auf externe Stimuli eine spezifische transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen durch ihre Histonazetyltransferase (HAT)-Aktivität. Der Einfluss der beiden Proteine auf zelluläre Transkriptionsvorgänge wird durch die Azetylierung von Histonen und Nicht-Histon-Proteinen vermittelt. Während diese Modifikation der Histon-Proteine die Chromatinstruktur verändert, führt die Azetylierung von p53 beispielsweise (Gu *et al.*, 1997) zu einer erhöhten DNA-Affinität *in vitro* (Sakaguchi *et al.*, 1998) und einer erhöhten Stabilität des Tumorsuppressors

(Ito *et al.*, 2001). Dies resultiert in einer Steigerung der p53-Transkriptionsrate *in vivo* (Lill *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 1997; Avantaggiati *et al.*, 1997; Barlev *et al.*, 2001; Espinosa *et al.*, 2001) und bewirkt letztlich eine verstärkte Transkription von p53-kontrollierten Genen. Wie die Aktivierung von p53 bereits andeutet, spielen p300 und CBP bei der Regulation der zellulären Wachstumskontrolle eine wichtige Rolle, was auch durch die Tatsache unterstrichen wird, dass beide Proteine tumorsupprimierende Eigenschaften besitzen und prominente Ziele von viralen Onkoproteinen darstellen (Abb.A.4).

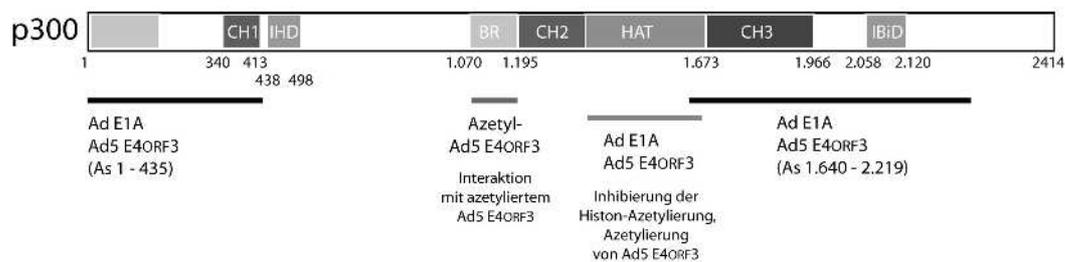
Die Immunpräzipitationsversuche im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass das Ad5 E4ORF3-Protein vermutlich über seinen Aminoterminus mit p300 interagiert (C.11). Für diese Wechselwirkung scheint insbesondere das NES-Signal seitens des viralen Proteins verantwortlich zu sein. Aminosäureaustausche in dieser Region führen zu einer deutlichen Abnahme, aber keineswegs zum vollständigen Verlust der Interaktion zwischen dem E4-Protein und p300. Frühere In-vitro-Bindungsanalysen konnten belegen, dass der Aminoterminus (AS 1 bis 28) für eine direkte Interaktion zwischen E4ORF3 und p300 notwendig ist (Täuber, 2002).

Die Interaktion zwischen p300 und der NES-Region von E4ORF3 könnte daher die Ursache für die überwiegende nukleäre Lokalisation des viralen E4-Proteins sein. Proteine, die eine NES-Domäne aufweisen, sind in der Lage, mit zellulären Exportproteinen (z.B. Crm1) und -faktoren zu interagieren (Bray *et al.*, 1994; Fischer *et al.*, 1994; Pollard und Malim, 1998) und dadurch den Transport viraler Transkripte aber auch die eigene Translokation ins Zytoplasma zu vermitteln. Durch die Bindung von p300 an E4ORF3 wird möglicherweise das Leucinreiche Exportsignal maskiert. Infolgedessen befindet sich nur ein geringer Anteil des viralen Proteins im Zytoplasma in Form der zellkernnahen Strukturen, die neuerdings als Aggresome bezeichnet werden (Ajauro *et al.*, 2005). Mutationen innerhalb dieses Signals schwächen dagegen die Bindung an p300. Dennoch ist eine Retention von E4ORF3 NES im Zellkern zu beobachten, da diese Mutante über kein funktionierendes Exportsignal mehr verfügt. Dies zeigt sich auch anhand von Immunfluoreszenz-Analysen, die belegen, dass E4ORF3 NES wesentlich ausgeprägtere E4ORF3-typische Strukturen im Zellkern ausbildet als das Wildtyp-Protein, während es im Zytoplasma nahezu vollständig verschwunden ist (Abb.C.7).

Die Vermutung liegt nahe, dass neben einer direkten Wechselwirkung von E4ORF3 mit p300 auch indirekte Interaktionen zwischen Beiden durch noch unbekannte zelluläre Faktoren vermittelt werden (Abb.D.1). Dies wird durch die Tatsache unterstrichen, dass E4ORF3 L103A, das in früheren In-vitro-Studien nur schwach an p300 bindet, *in vivo* in Hinblick auf die Interaktion mit p300 keinerlei Defekte im Vergleich zum Wildtyp-Protein aufweist.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass E4ORF3 nicht nur an den Aminoterminus und die CH3-Domäne bindet, sondern auch mit anderen Regionen innerhalb von p300 interagiert (Abb.D.1A). Denn die Mutante K8R, die nicht mehr am einzigen Lysinrest azetyliert werden kann, zeigt nur noch eine schwache Bindung an p300. Frühere Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass p300 und andere HAT-Enzyme (P/CAF; GCN5, TAF_{II}250) über eine zentrale Bromodomäne (Haynes *et al.*, 1992; Jeanmougin *et al.*, 1997) verfügen. Diese Domäne ist in der Lage, an Azetyl-Lysinen verschiedener zellulärer und viraler Faktoren (Histone, p53, HIV-1 Tat) zu binden (Dhalluin *et al.*, 1999b; Col *et al.*, 2001; Dyson *et al.*, 2001; Mujtaba *et al.*, 2002). Auch eine direkte Interaktion mit dem E4ORF3-Protein über die Bromodomäne von p300 ist daher denkbar.

A



B



Abb.D.1: Funktionell wichtige Bereiche für die Interaktion zwischen E4ORF3 und p300

Dargestellt sind die Interaktionsregionen von p300 (**A**) und von E4ORF3 (**B**). (**A**) Innerhalb von p300 konnten mit Hilfe von In-vitro-Bindungsstudien bereits der Aminoterminus (As 1 bis 435) und ein carboxyterminaler Bereich (As 1.640 bis 2.219) identifiziert werden, welche die Interaktion von p300 und E4ORF3 vermitteln (Täuber, 2002). Aufgrund der Azetylierung von E4ORF3 und dessen negativer Einfluss auf die Histonazetylierung ist davon auszugehen, dass E4ORF3 auch mit der HAT- bzw. der Bromodomäne von p300 interagiert. (**B**) Seitens des E4ORF3-Proteins ist sowohl der Aminoterminus (hellgraues Rechteck) als auch der Carboxyterminus (dunkelgraues Rechteck) für die Wechselwirkung mit p300 verantwortlich. Während die Interaktion mit p300 direkt über die NES-Region von E4ORF3 erfolgt und durch die Azetylierung von E4ORF3 verstärkt wird, vermittelt das Leucin¹⁰³ von E4ORF3 lediglich eine indirekte Interaktion mit dem Transkriptionskoaktivator p300. CH1, CH2, CH3: Cystein-Histidin-reiche Zinkfinger motive; BR: Bromodomäne; HAT: Histonazetyltransferase; NES: nukleäres Exportsignal; NR: nukleärer Hormonrezeptor. Die Zahlen unterhalb des E4ORF3- bzw. p300-Proteins geben die Position der entsprechenden Domänen an.

Im Einklang früherer Arbeiten machen diese Ergebnisse deutlich, dass die Interaktion zwischen E4ORF3 und p300 sehr komplex ist. Diese Wechselwirkung schließt nicht nur verschiedene Domänen von p300, sondern auch unterschiedliche Regionen seitens des E4ORF3-Proteins mit ein. Demzufolge ist es wahrscheinlich, dass die von Täuber beschriebene Interaktion mit dem Aminoterminus und der CH3-Region (Täuber, 2002) sowie der Bromodomäne von p300 auf unterschiedliche Weise erfolgt: entweder direkt über den Aminoterminus von E4ORF3 (NES, K8) oder indirekt über die (zeitlich regulierte) Interaktion mit unterschiedlichen zellulären Faktoren an verschiedenen Stellen des E4ORF3-Proteins.

D.3 Negativer Effekt von E4ORF3 auf die Histonazetylierung

Da in dieser und in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass E4ORF3 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an p300 binden kann (Täuber, 2002; C.13), liegt die Vermutung nahe, dass es ebenso wie E1A auch in die Regulation der Histonmodifikation eingreifen kann. Auf diese Weise könnte E4ORF3 durch die gezielte Veränderung der Chromatinstruktur Einfluss auf die zellulären Transkriptionsereignisse nehmen. Mit Hilfe eines indirekten ELISA-Testsystems wurde der Einfluss von E4ORF3 auf die Azetylierung von Histon H3 untersucht, das das Ziel vieler verschiedener HAT-Enzyme (p300/CBP, P/CAF, GCN5, SRC-1) darstellt (zur Übersicht: Sterner und Berger, 2000; Abb.C.16). Anhand dieser Experimente konnte gezeigt werden (C.14; Abb.C.17), dass das Wildtyp-Protein tatsächlich einen negativen Effekt auf die endogenen HAT-Enzyme und auf die Azetylierung von Histonen hat. Dabei setzt dieser inhibitorische Effekt von E4ORF3 keines-falls dessen Fähigkeit voraus, die Lokalisation von p300 zu modulieren. Eine Erklärung für den Einfluss von E4ORF3 auf die Histon-Modifizierung lässt sich möglicherweise aus Analogien zu E1A ableiten, das wie E4ORF3 mit p300/CBP interagiert. Durch die Bindung von E1A an den Aminoterminus von p300/CBP (Täuber, 2002; Shuen *et al.*, 2003) wird die Interaktion der beiden HAT-Enzyme P/CAF und p300/CBP verhindert (Chakravarti *et al.*, 1999). Darüber hinaus zeigen frühere Untersuchungen, dass E1A in der Lage ist, die HAT-Aktivität von p300/CBP und P/CAF sowohl *in vitro* als auch *in vivo* direkt zu blockieren (Chakravarti *et al.*, 1999; Hamamori *et al.*, 1999). Konträr hierzu sind jedoch die Beobachtungen von Reid und Kollegen, die keinen direkten Einfluss von E1A auf die HAT-Aktivität von P/CAF erkennen konnten, obwohl E1A mit der HAT-Domäne von P/CAF interagiert (Reid *et al.*, 1998). Da in

den bisherigen In-vitro-Bindungsstudien unserer Arbeitsgruppe lediglich die Interaktion von E4ORF3 mit dem Aminoterminus und der CH3-Region von p300 untersucht wurde, muss in weiteren Experimenten überprüft werden, ob die Effekte von E4ORF3 auf die Azetylierungsprozesse in Folge einer direkten Wechselwirkung mit der p300/CBP HAT-Domäne zurückzuführen ist, wie es für E1A gezeigt wurde (Chakravarti *et al.*, 1999).

E4ORF3-Mutanten, die Aminosäureaustausche in der Leucin-reichen Region am Carboxyterminus von E4ORF3 aufweisen (L111A und L115A) zeigen keinen wesentlichen Einfluss auf die Aktivität von endogenen HAT-Enzymen (Abb.C.17). Betrachtet man diese Region von E4ORF3 genauer, so fällt auf, dass diese die Sequenz LXXLL enthält (Abb.D.2A), welche die Hormon-abhängige Bindung von Transkriptionskoaktivatoren an nukleäre Rezeptoren vermittelt (Le Douarin *et al.*, 1996; Heery *et al.*; 1997, Torchia *et al.*, 1997a; Ding *et al.*, 1998; Heery *et al.*, 2001). CBP und p300 besitzen im Aminoterminus ebenfalls zwei dieser Bindemotive, die eine schwache Interaktion mit den Östrogen- und Retinsäure-Rezeptoren erlauben (Heery *et al.*, 1997). Dagegen bewirkt die Leucin-reiche Helix LXX(I/H)IXXX(I/L) die Hormon-unabhängige Bindung der beiden Transkriptionskorepressoren SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors*) und NCOR (*nuclear receptor corepressor*) an nukleäre Rezeptoren (Xu und Lazar, 1999, Nagy *et al.*, 1999; Perissi *et al.*, 1999). Dies führt zur Repression der nukleären Rezeptoren durch die Rekrutierung des Histondeazetylase (HDAC)-Komplexes (Alland *et al.*, 1997; Hassig *et al.*, 1997; Heinzl *et al.*, 1997; Laherty *et al.*, 1997; Nagy *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997) und schließlich zur Inhibierung der basalen Transkriptionsaktivität. Im Gegensatz dazu können p300/CBP und P/CAF (Kamei *et al.*, 1996; Yao *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997; Blanco *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 2001) aufgrund ihrer intrinsischen HAT-Aktivität die transkriptionelle Aktivität von Ligand-gebundenen Hormonrezeptoren erhöhen. Demzufolge könnte das Ad5 E4ORF3-Protein entweder in Form eines Korepressor oder als Koaktivator auf unterschiedliche Weise Einfluss auf zelluläre Transkriptionsereignisse ausüben, da es einerseits über zwei potenzielle inhibitorische Motive 24-IRDLLRDIL-31 und 103-LIDLHEEVL-111, andererseits jedoch über zwei aktivierende Sequenzen 24-IRDLL-28 bzw. 111-LDNLL-115 verfügt (Abb.D.2A und B). Die Überlappung des inhibitorischen und des aktivierenden Signals am Amino- und Carboxyterminus unterstreicht die Vermutung (Abb.D.2B), dass E4ORF3 verschiedene Funktionen bei der Transkriptionsregulation ausüben kann, die aber genau reguliert werden können und sich gegenseitig ausschließen. In Virusinfektionen zeigte sich, dass E4ORF3 die Menge an mRNA von Hormon-abhängigen Genen deutlich erhöht (Wienzek und Dobbstein, 2001).

Ob dies jedoch auf Vorgänge während der Transkription oder auf posttranskriptionelle Prozesse (z.B. RNA-Stabilität) zurückzuführen ist, bleibt jedoch nach wie vor unklar.

Eindeutig ist dagegen die Tatsache, dass Mutationen am potenziellen carboxyterminalen Motiv (111-LDMLL-115) den negativen Effekt von E4ORF3 auf die Histonazetylierung aufheben. Das würde bedeuten, dass E4ORF3 die Azetylierung von Histonen durch die Wechselwirkung mit NRs regulieren könnte. Dabei ist dies möglicherweise weniger auf eine Kompetition von E4ORF3 und den NRs um die Bindung an den Aminoterminus von p300/CBP, sondern vielmehr auf eine direkte Interaktion zwischen E4ORF3 und den NRs über das LXXLL-Motiv zurückzuführen (Abb.D.2D). In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass p300/CBP generell die Aktivität von NRs durch ihre intrinsische HAT-Aktivität erhöhen können (Ogryzko *et al.*, 1996; Struhl, 1998; Sterner und Berger, 2000). Die Azetylierung von NRs bewirkt die Dissoziation von Korepressoren (NCOR, SMRT) und in der Folge die Rekrutierung und Bindung von Transkriptionskoaktivatoren (McKenna *et al.*, 1999; Kouzarides, 2000). Es wäre demnach möglich, dass E4ORF3 nicht nur die Azetylierung von Histonen durch die Interaktion mit p300, sondern auch die Azetylierung von NRs blockiert und somit eine Repression der Transkription vermittelt. Die Inhibierung der NR-Azetylierung könnte entweder durch die direkte Wechselwirkung von E4ORF3 und NRs oder durch die Interaktion von E4ORF3 mit dem Aminoterminus von p300 erfolgen, welche die Bindung von NRs an p300 verhindert (Abb.D.2C).

Die Mutante K8R, die selbst nicht mehr am einzigen Lysinrest innerhalb der E4ORF3-Sequenz azetyliert werden kann, verstärkt sogar noch die Inhibierung der Histonazetylierung (C.14; Abb.C.17). Analog zu NRs könnte die fehlende Azetylierung des E4ORF3-Proteins zwar die Interaktion mit p300 verringern, aber gleichzeitig die Bindung an Korepressor-Komplexe erhöhen (Fu *et al.*, 2003), die durch die Rekrutierung von HDACs den HAT-Enzymen möglicherweise entgegenwirken. Dies könnte in letzter Konsequenz zu einer verringerten Azetylierungsrate von Histon-Proteinen und damit zu einer Repression der Transkription insgesamt führen. Dennoch ist es durchaus möglich, dass E4ORF3 in Analogie zu E1A unterschiedliche Effekte bei dem Zusammenspiel mit verschiedenen HAT-Enzymen (p300 und CBP) auf die HAT-Aktivität hat. Frühere Untersuchungen zeigen nämlich, dass E1A durch die Interaktion mit p300 dessen HAT-Aktivität inhibiert (Chakravarti *et al.*, 1999; Perissi *et al.*, 1999). Ait-Si-Ali und Kollegen konnten dagegen bei CBP eine E1A-vermittelte Aktivierung der intrinsischen HAT-Domäne von CBP feststellen (Ait-Si-Ali *et al.*, 1998).

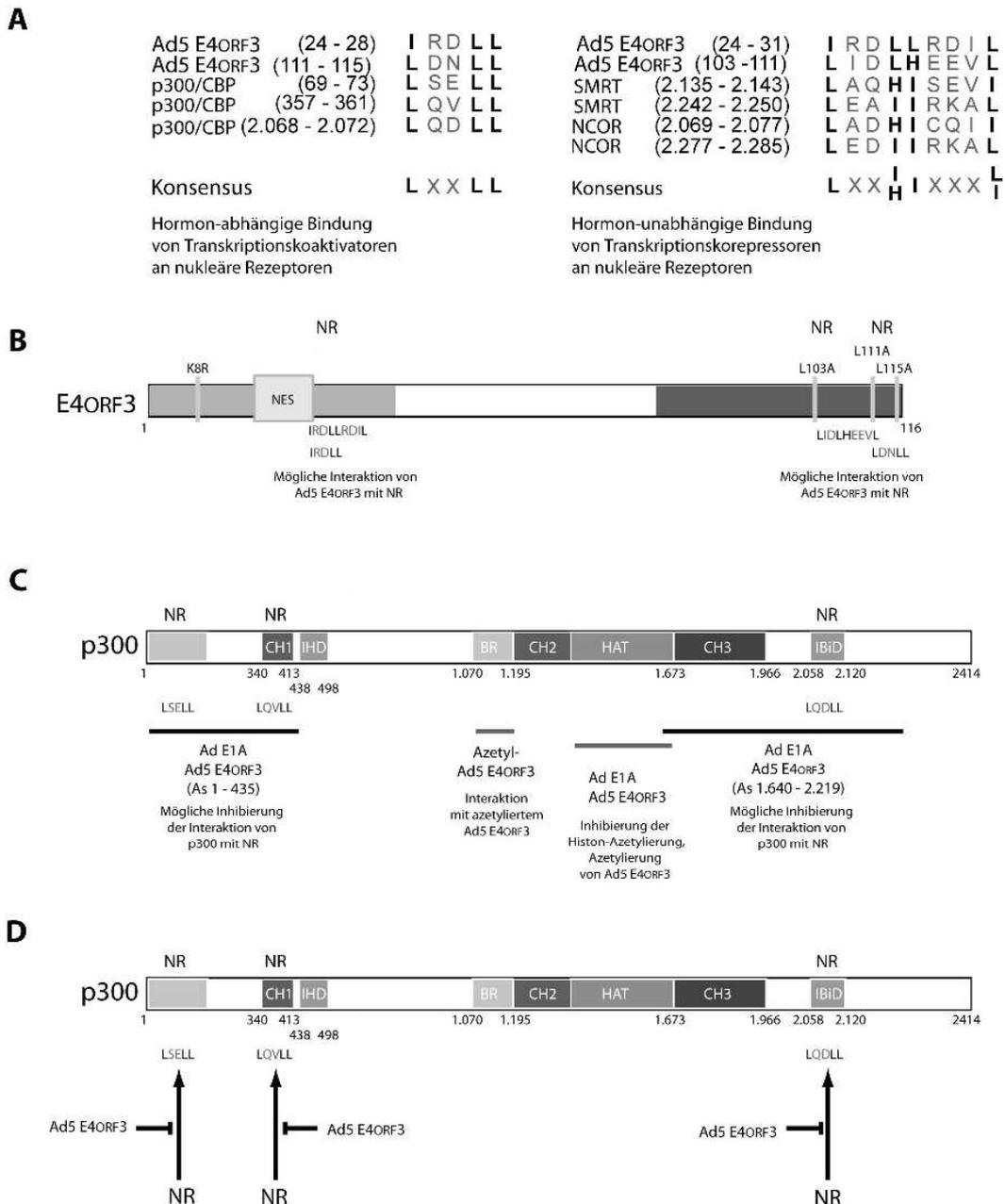


Abb.D.2: Einfluss von E4ORF3 auf p300 und/oder nukleäre Hormonrezeptoren

(A und B) Die Leucin-reichen Abschnitte am Aminoterminus (hellgraues Rechteck) bzw. am Carboxyterminus (dunkelgraues Rechteck) des E4ORF3-Proteins zeigen eine große Ähnlichkeit zu der Konsensussequenz von NR-bindenden Proteinmotiven. Da E4ORF3 sowohl über aktivierende als auch über inhibitorische Domänen verfügt, kann E4ORF3 keine eindeutige Funktion als Transkriptionsaktivator bzw. -repressors zugeordnet werden. (C) Der Transkriptionskoaktivator p300 besitzt ebenso wie E4ORF3 aktivierende LXXLL-Motive. Diese befinden sich am äußersten Aminoterminus, innerhalb der CH1- und der IBiD-Domäne. (D) Der Einfluss von E4ORF3 auf die Interaktion zwischen p300 und NRs kann auf zweierlei Arten erfolgen: einerseits über die Konkurrenz von E4ORF3 und NRs bezüglich der Bindung an denselben Bindungsstellen innerhalb des p300-Proteins (Aminoterminus, CH1 und IBiD), andererseits durch die direkte Interaktion der NR-bindenden E4ORF3-Domänen mit NRs, welche die Interaktion zwischen p300 und NRs verhindert. Dies zeigt einen weiteren Mechanismus, auf welche Weise das E4ORF3-Protein die Funktion von p300 als Transkriptionskoaktivator beeinflussen bzw. inhibieren kann. CH1, CH2, CH3: Cystein-Histidin-reiche Zinkfinger motive; BR: Bromodomäne; IBiD: *interferon-binding domain*; IHD: *IBiD homology domain*; HAT: Histonazetyltransferase; NES: nukleäres Exportsignal; NR: nukleärer Hormonrezeptor. Die Zahlen unterhalb des E4ORF3- bzw. p300-Proteins geben die Positionen der entsprechenden Domänen an.

Daher bestehen große Schwierigkeiten darin, dem E4ORF3-Protein eine eindeutige Funktion als Transkriptionsaktivator oder -repressor zuzuschreiben. Dies ist auch auf die komplexen Vorgänge bei der Regulation von p300 und der Transkription im Allgemeinen zurückzuführen.

Betrachtet man p300/CBP genauer, so fällt auf, dass beide Proteine beispielsweise mehrere Funktionen bei der Regulation des Zellzyklus haben. Einerseits kann p300/CBP durch Interaktion mit E2F den Übergang von der G₁- zur S-Phase vermitteln (Qin *et al.*, 1994; Trouche *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998), andererseits sind beide Proteine durch die Assoziation mit p53 beispielsweise in der Lage, Zellzyklusarrest bzw. Zelldifferenzierung zu induzieren (zur Übersicht: Snowden und Perkins, 1998). Darüber hinaus ist p300/CBP selbst einer komplexen, Zellzyklus-abhängigen Regulation unterworfen. So stimuliert die Phosphorylierung durch die CyclinE/Cyclin-abhängigen Kinase 2 (CDK2) die intrinsische HAT-Aktivität von p300/CBP und ermöglicht so den Eintritt in die S-Phase (Perkins *et al.*, 1997; Ait-Si-Ali *et al.*, 2000). Darüber hinaus wird die transkriptionelle Aktivität von p300/CPB durch die p21-vermittelte Inhibierung des CyclinE/CDK2-Komplexes reguliert (Perkins *et al.*, 1997; Snowden *et al.*, 2000). Laut früheren Beobachtungen aktiviert der CDK-Inhibitor p21 in Kooperation mit p300/CBP Transkriptionsfaktoren wie p53, die an der Regulation des Zellzyklusarrest oder Zelldifferenzierung beteiligt sind (zur Übersicht: Perkins, 2002). Andererseits zeigen die Ergebnisse aus *Microarray*-Experimenten, dass p21 die Expression von wachstumsstimulierenden und antiapoptotischen Faktoren induziert (Chang *et al.*, 2000; Perkins, 2002).

Die unterschiedlichen Funktionen von p300/CBP bei zellulären Transkriptionsereignissen werden womöglich durch dessen zentrale Repressordomäne CRD1 (*cell-cycle regulatory domain 1*) vermittelt (Snowden *et al.*, 2000; Girdwood *et al.*, 2003), deren Aktivität durch p21 Promotor-abhängig aufgehoben werden kann (Snowden *et al.*, 2000; Gregory *et al.*, 2002).

Außerdem ist die CRD1-Region selbst auch in der Lage, der Histondeazetylase HDAC6 zu interagieren. Es wird daher angenommen, dass die p300-abhängige Repression der Transkription nicht nur durch die Inhibierung der intrinsischen HAT-Aktivität, sondern auch mittels Rekrutierung von HDAC-Enzymen reguliert wird (Girdwood *et al.*, 2003).

In diesem Zusammenhang ist es durchaus denkbar, dass E4ORF3 die Aktivität von HDAC-Enzymen beeinflusst. Dies konnte bereits bei einem weiteren adenoviralen Protein, Ad2 E1B-55kDa, beobachtet werden. So wurde gezeigt, dass Ad2 E1B-55kDa *in vitro* und in transfizierten Zellen an HDAC1 binden kann (Punga und Akusjärvi, 2000). In Säugerzellen bildet HDAC1 zusammen mit mSin3A einen Multiprotein-Komplex (Laherty *et al.*, 1997), der als

Korepressor für verschiedene Transkriptionsrepressoren, wie beispielsweise SMRT und NCOR, (zur Übersicht: Knoepfler und Eisenman, 1999) dient. Die Interaktion von E1B-55kDa und HDAC/mSin3A lässt einen Komplex entstehen, der eine HDAC-Aktivität aufweist (Punga und Akusjärvi, 2000). Dies wurde anhand des Histon-Peptids H4 deutlich. Vorläufige Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten dieses Ergebnis bestätigen, doch gibt es Hinweise, dass E1B-55kDa ebenso wie E4ORF3 eine spezifische Wirkung auf den Azetylierungsgrad verschiedener Histon-Proteine hat. Während Ad5 E1B-55kDa zu einer Reduktion an azetyliertem Histon H4-Protein führt, kann für Histon H3 eine deutliche Zunahme der Azetylierung beobachtet werden. Interessanterweise konnte für das E4ORF3-Protein ein genau gegenläufiger Effekt beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Ob die unterschiedlichen Einflüsse von E4ORF3 auf verschiedene Histone auf die gezielte Interaktion mit HAT- und/oder HDAC-Enzymen zurückzuführen sind, muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Neben Ad5 E1B-55kDa gibt es noch weitere virale Proteine, die die Funktionen von HDACs modulieren können. Dazu zählen Adenovirus Gam1 und HCMV IE1. Beide Proteine sind in der Lage, die punktförmigen Strukturen der PML NBs zu modifizieren (Alcalay *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2001). Darüber hinaus zeichnen sich beide Proteine durch ihre Fähigkeit aus, die Transkriptionsraten von zellulären und viralen Genen zu erhöhen, indem sie die Aktivität von spezifischen HDACs inhibieren (Alcalay *et al.*, 1998; Nevels *et al.*, 2004b). Mit Hilfe von HDAC-Inhibitoren konnte die Replikation von IE1- bzw. Gam1-deletierten Virusmutanten wiederhergestellt werden (Chiocca *et al.*, 2002; Nevels *et al.*, 2004a). Dies stimmt mit früheren Beobachtungen überein, die zeigten, dass HDACs eine wichtige Rolle bei der (intra)zellulären Abwehr von Virusinfektionen spielen können (Murphy *et al.*, 1999; Meier, 2001; Shestakova *et al.*, 2001; Zhang und Jones, 2001; Merezak *et al.*, 2002).

Zusammengefasst lassen die Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass die Wirkung von E4ORF3 auf die Transkription insbesondere von der Inhibierung der Histonazetylierung abhängig ist. Ob dies durch die spezifische Inhibierung von p300 gelingt oder ob in Analogie zu E1A andere HAT-Enzyme mögliche Ziele von E4ORF3 darstellen, muss in weiterführenden Experimenten überprüft werden. Reporterversuche unserer Arbeitsgruppe mit dem Gal4-p300-Fusionsprotein konnten in diesem Zusammenhang bereits zeigen, dass E4ORF3 die p300-vermittelte Transkriptionsaktivierung direkt inhibieren kann (Täuber, 2002). Auch wenn die bisherigen Erkenntnisse hauptsächlich auf eine E4ORF3-vermittelte Regulation der p300-Funktionen hindeuten, darf ein möglicher Einfluss von E4ORF3 auf die Aktivität von HDACs nicht außer Acht gelassen werden. Die Tatsachen, dass es innerhalb eines Virus mehrere

Proteine gibt, die über die Regulation der Azetylierung die Chromatinstruktur und die Transkription unterschiedlich beeinflussen, machen deutlich, wie geschickt die zellulären Vorgänge für die Belange des Virus moduliert werden.

D.4 Azetylierung von E4ORF3 an Lysin⁸

Aufgrund der vielen Übereinstimmung zwischen den beiden frühen adenoviralen Genprodukten E4ORF3 und E1A auf funktioneller Ebene stellt sich die Frage, ob auch in Hinblick auf die eigene Modifizierung Gemeinsamkeiten zwischen den viralen Proteinen bestehen. Frühere Untersuchungen zeigten bereits, dass beide viralen Proteine redundante Funktionen bei der Regulation von Transkriptionsprozessen haben. Die Annahme, dass auch E4ORF3 trotz der selbstvermittelten Inhibition der Histonazetyltransferase-Aktivität dieser posttranslationalen Modifizierung unterzogen wird, konnte mit Hilfe von Immunpräzipitationsanalysen bestätigt werden (C.15; Abb.C.18). Laut diesen Ergebnissen wird der Aminoterminus von E4ORF3 am einzigen Lysinrest an Position 8 *in vivo* modifiziert. Denn mit Hilfe des spezifischen Azetyl-Lysin-Antikörpers konnte in der *Western Blot*-Analyse immunpräzipitiertes E4ORF3 Wt-Proteins nachgewiesen werden, das etwas langsamere Laufgeschwindigkeiten aufwies als nicht-azetyliertes E4ORF3. Bezogen auf die Gesamtmenge an E4ORF3 werden ca. 10% der gesamten E4ORF3-Population dieser Azetylierung unterzogen. Um sicherzustellen, dass es sich aber tatsächlich um modifiziertes E4ORF3 handelt, sollen zukünftige Experimente mit *in vitro* azetylierten und radioaktiv-markierten E4ORF3 wiederholt werden. Dennoch zeigen diese Studien, dass neben E1A noch ein weiteres adenovirales Protein, E4ORF3, durch HAT-Enzyme modifiziert wird. Die direkte Interaktion von E4ORF3 mit p300 lässt vermuten, dass die Azetylierung von E4ORF3 durch p300 erfolgt. Die genaue Funktion dieser Modifizierung ist jedoch leider noch unklar. Die Ergebnisse aus In-vitro-Experimenten zeigen aber, dass die Modifizierung von E4ORF3 durch endogene HAT-Enzymen einen positiven Effekt auf die Azetylierung von Histon H3 hat (Abb.C.18). Die Mutation von Lysin⁸ resultiert in einer verstärkten Inhibierung der Histonmodifikation. Einen ähnlichen Effekt kann man auch bei E1A beobachten, das nach Bindung an p300 am Lysin²³⁹ azetyliert wird. Diese Modifizierung verhindert in der Folge die Interaktion mit CtBP (*carboxyl-terminal binding protein*), das als Transkriptionskorepressor mit HDACs assoziiert vorliegt. Zhang und Kollegen gehen deshalb davon aus, dass durch die Azetylierung von E1A dieser

Repressorkomplex nicht mehr an E1A binden kann und auf diese Weise die Aktivierung bestimmter Gene ermöglicht wird (Zhang *et al.*, 2000). In der Annahme, dass nur 10% von E4ORF3 dieser Modifizierung unterzogen wird, kann man davon ausgehen, dass E4ORF3 in der Hauptsache die Funktion eines Repressorproteins übernimmt. Dennoch ist E4ORF3 ebenso wie E1A in der Lage nach Azetylierung die Transkriptionsraten bestimmter Gene spezifisch zu erhöhen und damit als Transkriptionskoaktivator zu fungieren, wie die Beobachtungen von Wienzek und Dobbstein bei der Aktivierung von Hormon-abhängigen Promotoren durch E4ORF3 vermuten lassen (Wienzek und Dobbstein, 2001).

D.5 Azetylierung von p53 durch E4ORF3

Die Azetylierung von verschiedenen Histon-Proteinen spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Transkription. Dennoch zeigen eine Vielzahl von Studien, dass neben Histonen auch so genannte Nichthiston-Proteine Substrate für HAT-Enzyme darstellen. Die Azetylierung von p53 erfolgt hauptsächlich als Reaktion auf DNA-Schäden (Liu *et al.*, 1999; Sakaguchi *et al.*, 1998). So bewirkt diese p300/CBP-vermittelte Azetylierung beispielsweise, dass p53 *in vitro* mit höherer Affinität an DNA bindet (Sakaguchi *et al.*, 1998), stabilisiert wird (Ito *et al.*, 2001) und seine Transkriptionsrate *in vivo* gesteigert wird (Lill *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 1997; Avantaggiati *et al.*, 1997; Barlev *et al.*, 2001; Espinosa *et al.*, 2001). P53 ist dadurch in Lage, verschiedener zellulärer Gene, wie *p21*, *cyclin G*, *mdm2* und *bax1* zu aktivieren. Die Produkte dieser Gene spielen wichtige Rollen bei der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse wie Zellzykluskontrolle, DNA-Replikation und Apoptose (Gottlieb und Oren, 1996; Ko und Prives, 1996; Levine, 1997). In der Zwischenzeit konnte bereits für einige frühe adenovirale Proteine gezeigt werden, dass sie die Aktivität von p53 modulieren und dadurch seine normale biologische Funktion stören können. Als erstes adenovirales Protein, das p53 inhibieren kann, wurde E1B-55kDa identifiziert (Yew und Berk, 1992). Yew und Kollegen konnten zeigen, dass E1B-55kDa durch Bindung an p53 dessen transaktivierende Funktionen blockiert, obwohl der Tumorsuppressor noch an seine Konsensussequenzen innerhalb der Promotorregion bindet (Yew *et al.*, 1994). Ein weiteres adenovirales Protein, das mit p53 interagiert, stellt E4ORF6 dar. Dobner und Kollegen konnten zeigen, dass E4ORF6 die Aktivität von p53 blockieren kann, indem es direkt mit dessen Carboxyterminus interagiert und damit die Bindung von TAF32 an die Aktivierungsdomäne von p53 verhindert

(Dobner *et al.*, 1996). Zusammen mit E1B-55kDa ist E4ORF6 zudem für den proteasomalen Abbau von p53 verantwortlich, wie die Ergebnisse mit Adenovirus-infizierten und in transient transfizierten Zellen belegen (Querido *et al.*, 1997; Roth *et al.*, 1998; Steegenga *et al.*, 1998; Querido *et al.*, 2001; Blanchette *et al.*, 2004). In Ad E1-transformierten Zellen, in denen kein E4ORF6 vorhanden ist, ist eine p53-Stabilisierung durch E1A (Lowe und Ruley, 1993) und E1B (Van den Heuvel *et al.*, 1993) zu beobachten. Diese Zellen sind durch die Inhibition der transaktivierenden p53-Funktionen durch die beiden adenoviralen Proteine (Somasundaram und El-Deiry, 1997; Steegenga *et al.*, 1996) nämlich in der Lage, selbst größere Mengen an inaktivierten p53 zu tolerieren.

Der Einfluss von E1A auf die Funktion von p53 wird in erster Linie durch die Interaktion des viralen Proteins mit dem Transkriptionskoaktivator p300 vermittelt (Thomas und White, 1998; Chiou *et al.*, 1997, Gu und Roeder, 1997; Gu *et al.*, 1997; Lill *et al.*, 1997). Die E1A-vermittelte Stabilisierung von p53 ist dabei auf die Inhibierung des Komplexes bestehend aus p300 und Mdm2 zurückzuführen, der für die Polyubiquitinylierung und Degradierung von p53 verantwortlich ist (Grossman *et al.*, 1998; Lai *et al.*, 2001; Rodriguez *et al.*, 2000; Grossman *et al.*, 2003).

Dem E4ORF3-Protein, das ebenso wie E1A mit p300 interagieren kann, wurde lange Zeit keinen direkten Einfluss auf p53 zugeschrieben. Zwar konnten König und Kollegen 1999 nachweisen, dass E4ORF3 die E1B-vermittelte Repression von p53 aufheben kann, aber sie führten darauf zurück, dass E4ORF3 die Repression von E1B-55kDa durch dessen Relokalisation in den Zellkern aufheben kann (König *et al.*, 1999). Darüber hinaus zeigte sich in transient transfizierten Zelllinien und in transformierten Rattennierenzellen, dass E4ORF3 zusammen mit E1B-55kDa die p53-Mengen nicht beeinflussen konnte, während in entsprechenden E1B-55kDa- und E4ORF6-enthaltenden Zellen eine Destabilisierung von p53 zu beobachten war (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997a; Querido *et al.*, 1997; Steegenga *et al.*, 1998; König *et al.*, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit ist es jedoch mit Hilfe von Immunpräzipitationsanalysen gelungen, eine (indirekte) Interaktion zwischen E4ORF3 und p53 in BRK1-Zellen nachzuweisen (C.16; Abb.C.19). Interessanterweise zeigt die Mutante L103A, die eine vorwiegende zytoplasmatische Lokalisation aufweist, dabei eine stärkere Bindung an p53 als das nukleäre Wildtyp-Protein. Dies lässt darauf schließen, dass die Interaktion zwischen diesem viralen Protein und dem Tumorsuppressor entweder im Zytoplasma stattfindet oder dass E4ORF3 L103A nach der Bindung von p53 im Zellkern und aufgrund der eingeschränkten Wechselwirkung mit p300 (Täuber, 2002) und Retention im Zellkern ins Zytoplasma exportiert wird. Die Interaktion von E4ORF3 und p53 erfolgt unabhängig

von der Azetylierung des E4ORF3-Proteins, da sowohl das Wildtyp-Protein als auch die Mutante K8R nahezu gleiche Mengen an p53 präzipitieren können. Darüber hinaus ist E4ORF3 in der Lage, nicht nur an p53 zu binden, sondern in Folge dieser Interaktion auch die Azetylierung von p53 stark einzuschränken (C.16; Abb.C.19). Von großer Bedeutung ist dabei die Beobachtung, dass die E4ORF3-Mutante, die selbst nicht mehr azetyliert wird und eine weitere Reduktion der Histonazetylierung im Vergleich zum Wildtyp-Protein bewirkt, die Azetylierung von p53 signifikant erhöht. Dies unterstreicht die Rolle des frühen E4-Proteins in der selektiven Regulation der zellulären, aber auch viralen Transkription. So stellt die geringe Azetylierung von p53 in Anwesenheit von E4ORF3 Wt einen weiteren Mechanismus von Ad5 dar, die Funktion von p53 gezielt zu blockieren. Die stark verminderte Menge an azetyliertem p53 ist dabei nicht auf eine Abnahme der p53-Gleichgewichtsmengen insgesamt zurückzuführen. Dies steht im Einklang mit früheren Beobachtungen unserer und anderer Arbeitsgruppen (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997; Querido *et al.*, 1997; Steegenga *et al.*, 1998; König *et al.*, 1999; Nevels *et al.*, 2000). Damit scheint E4ORF3 - anders als Mdm2 - durch die Inhibierung der Azetylierung auch die Ubiquitylierung an denselben Lysinresten in der carboxyterminalen Region von p53 zu verhindern (Gu und Roeder, 1997; Sakaguchi *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 2000).

Eine mögliche Erklärung für den Einfluss von E4ORF3 auf die Modifizierung von p53 könnten frühere In-vitro-Bindungsstudien liefern (Täuber, 2002; Abb.C.11). Dort konnte gezeigt werden, dass E4ORF3 ebenso wie p53 am Aminoterminus und in der CH3-Domäne am Carboxyterminus von p300 bindet (Abb.D.3B). Demzufolge besteht die Möglichkeit, dass E4ORF3 durch die Interaktion mit p300 und/oder p53 die Wechselwirkung des Tumorsuppressors mit p300 verhindert (Abb.D.3A und C). Neuesten Untersuchungen zufolge besitzt das p300-Protein mehrere Domänen, die eine Interaktion von p300 mit dem LXXLL-Motiv innerhalb der aminoterminalen Aktivierungsdomäne von p53 erlauben. Diese p300-Domänen werden als IHD (*IBiD homology domain*) oder IBiD (*interferon-binding domain*) bezeichnet und befinden sich am Aminoterminus bzw. am Carboxyterminus von p300. Es ist durchaus denkbar, dass auch das E4ORF3-Protein, das selbst zwei putative LXXLL-Motive besitzt, mit diesen p53-bindenden Regionen interagiert und diese Weise die p300/p53-Interaktion zumindest teilweise blockiert (Abb.D.3A und C).

Laut Finlan und Hupp müssen für die p300-vermittelte Azetylierung von p53 zwei Voraussetzungen erfüllt werden. Die Interaktion von p300 mit dem LXXLL-Motiv von p53 und die Anwesenheit einer spezifischen DNA-Sequenz, die als allosterischer Aktivator die konforma-

tionellen Einschränkungen einer p53-Modifizierung aufhebt. Bislang bleibt jedoch die Frage unbeantwortet, welche Voraussetzungen für eine stabile Interaktion zwischen p53 und p300 gegeben sein müssen.

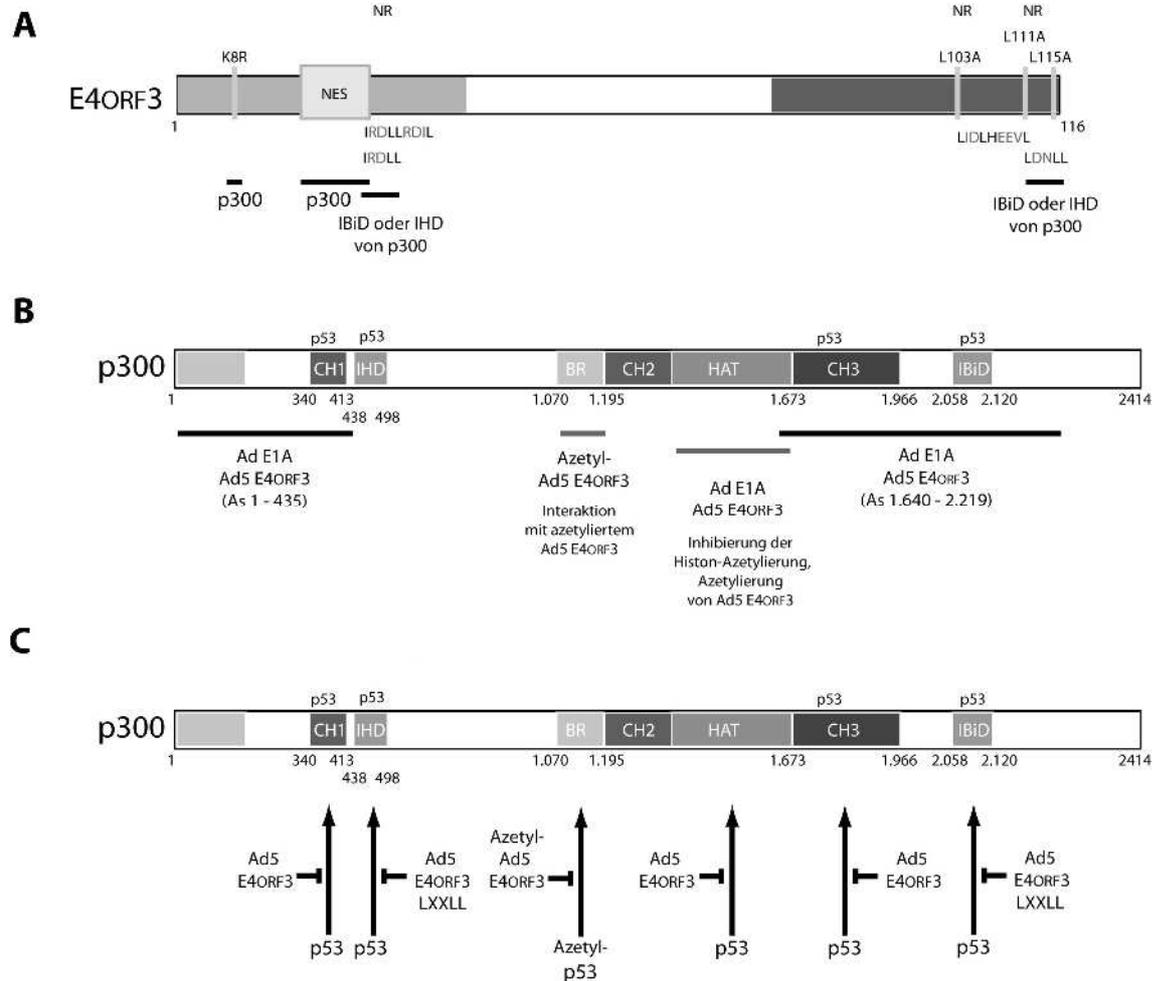


Abb.D.3: Die Interaktion zwischen E4ORF3 und p53

(A) Dargestellt sind die Leucin-reichen Abschnitte des E4ORF3-Proteins, die in Analogie zu dem LXXLL-Motiv von p53 an die IHD und IBiD-Domänen von p300 binden könnten. (B) Demzufolge bindet das E4ORF3-Protein neben der CH1-, Bromo-, HAT- und CH3-Domäne wahrscheinlich auch an die IHD-Region am Aminoterminus und an die IBiD-Domäne im Carboxyterminus von p300. (C) Der Einfluss von E4ORF3 auf p53 und dessen Azetylierung könnte damit auf verschiedene Arten erfolgen: einerseits indirekt durch die Konkurrenz um dieselben Bindestellen innerhalb des p300-Proteins, andererseits durch die direkte Interaktion zwischen E4ORF3 und p53, welche die Interaktion zwischen p300 und dem Tumorsuppressor verhindert. Dies deutet auf einen weiteren Mechanismus hin, der es dem E4ORF3-Protein erlaubt, die Funktionen des Tumorsuppressors p53 zu beeinflussen bzw. zu inhibieren. CH1, CH2, CH3: Cystein-Histidin-reiche Zinkfinger motive; BR: Bromodomäne; IBiD: *interferon-binding domain*; IHD: *IBiD homology domain*; HAT: Histonazetyltransferase; NES: nukleäres Exportsignal; NR: nukleärer Hormonrezeptor. Die Zahlen unterhalb des E4ORF3- bzw. p300-Proteins geben die Position der entsprechenden Domänen an.

Neben der Wechselwirkung von p53 mit weiteren Protein-bindenden Domänen innerhalb von p300 (z.B. CH1, CH3, IBiD, IHD), wird auch diskutiert, ob die Azetylierung von p53 für die

Ausbildung und Stabilität des p53/p300-Komplexes nötig ist. Derart modifiziertes p53 könnte zusätzlich mit der zentralen Bromodomäne von p300 interagieren und somit zur Stabilisierung des Komplexes beitragen (Finlan und Hupp, 2004). Demzufolge könnte die geringere Azetylierung von p53 in Anwesenheit des E4ORF3-Proteins auf eine Verdrängung von p53 durch das adenovirale Protein zurückgeführt werden.

Die azetylierungsdefiziente Mutante K8R, die möglicherweise nicht mit der p300-Bromodomäne interagieren und dementsprechend schwächer an p300 bindet als das Wildtyp-Protein, ist daher nicht in der Lage, die Interaktion zwischen p53 und p300 wirkungsvoll zu verhindern. Dies führt zu einer hohen (p300-abhängigen) Azetylierungsrate von p53. Die gesteigerte Azetylierung des Tumorsuppressors könnte erklären, warum es bislang nicht gelungen ist, stabile Zelllinien aus den *Focis* von E1/E4ORF3 K8R-transformierten Rattennierenzellen zu generieren. Möglicherweise verhinderte die p53-vermittelte Apoptose und/oder Zellzyklusarrest dieses Vorhaben.

Ein weiterer Punkt, der für eine Verdrängung von p53 von p300 durch E4ORF3 spricht, ist die Tatsache, dass auch bei anderen viralen Onkoproteinen angenommen wird, dass sie mit p53 um die Bindung an p300 konkurrieren. Dies wird beispielsweise für das SV40 TAg vermutet, da es in der Lage ist, an p300 zu binden (Eckner *et al.*, 1996) und in der Folge die p53-abhängigen Funktionen zu verhindern. Daneben konnte für Ad2 E1B-55kDa gezeigt werden, dass es die Azetylierung von p53 durch P/CAF *in vitro* und *in vivo* verhindern kann (Liu *et al.*, 2000). Dieser Einfluss des E1B-Proteins ist dabei auf eine Inhibierung der physikalischen Interaktion zwischen p53 und dem HAT-Enzym zurückzuführen.

DNA-Viren haben Strategien entwickelt, um Zellzyklusarrest und Apoptose zu verhindern, da die Virusreplikation nur während der S-Phase des Zellzyklus möglich ist. E4ORF3 etabliert sich nun als eines von mehreren frühen adenoviralen Proteinen, die auf unterschiedliche Weise Einfluss auf diese zellulären Vorgänge nehmen können. Ein wichtiges zelluläres Zielprotein ist dabei der Tumorsuppressor p53, der eine zentrale Position bei der stressbedingten Regulation der Apoptose und des Zellzyklus einnimmt. E4ORF3 ist aufgrund seiner Wechselwirkungen in der Lage, die Funktionen von p53 und auch die des Transkriptionskoaktivators p300 sowie anderer HAT-Enzymen zu blockieren. Dadurch kann E4ORF3 möglicherweise gezielt in die Zellzykluskontrolle eingreifen, Zellzyklusarrest und Apoptose verhindern, eine Erhöhung der DNA-Syntheserate gewährleisten und durch die Inhibierung der p53-Transaktivierung zur Adenovirus-induzierten Zelltransformation beitragen (Yew und Berk, 1992; Ricciardi, 1995).

D.6 Funktionen von E4ORF3 während der lytischen Infektion

Mit Hilfe von E4ORF3-Deletionsmutanten konnten bislang eine Reihe von Funktionen des frühen, viralen Proteins nachgewiesen werden. Zu diesen Funktionen in der lytischen Infektion zählen neben Steigerung der viralen DNA-Replikation, der späten viralen Proteinsynthese und somit die Produktion von Nachkommenviren auch das Abschalten der zellulären Proteinsynthese, (Halbert *et al.*, 1985; Bridge und Ketner, 1989; Huang und Hearing, 1989a; Bridge und Ketner, 1990). Desweiteren wird E4ORF3 auch die Inhibierung der Konkatemisierung viraler Genome zugeschrieben (Weiden und Ginsberg, 1994). Dennoch bleibt der genaue Mechanismus bislang unklar. Erste Anhaltspunkte für die Aufklärung liefert allerdings die Identifizierung zellulärer (DNA PK, p300/CBP) und viraler Interaktionspartner von E4ORF3 (E1B-55kDa) (Boyer *et al.*, 1999; Evans und Hearing, 2003; Leppard und Everett, 1999). Da jedoch E4ORF3-Virusmutanten existieren, deren E4ORF3 mit keinem der bekannten Faktoren interagieren können und die dennoch wie Wildtyp replizieren (Evans und Hearing, 2003), kann man davon ausgehen, dass der primäre Bindungspartner des E4-Proteins noch nicht identifiziert wurde.

Einen weiteren Hinweis auf die Funktion liefert die etablierte Meinung, wonach E4ORF3 für die Reorganisation der nukleären PML NBs verantwortlich ist (Carvalho *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996; Ishov und Maul, 1996). Aber auch in diesem Fall sind die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen für die E4ORF3-vermittelten Veränderungen in der nukleären Architektur sowie die Konsequenzen, die sich aus dieser Umstrukturierung ergeben, noch unklar. Fest steht allerdings, dass für die Ausbildung der typischen E4ORF3-Strukturen keineswegs der Hauptbestandteil der PML NBs das PML-Protein benötigt wird, wie die Überexpression von E4ORF3 in PML^{-/-} MEF-Zellen belegt (C.8; Abb.C.9). Dies steht im Einklang mit früheren Ergebnissen, wonach keine direkte physikalische Interaktion zwischen beiden Proteinen nachgewiesen werden konnte (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1999b). Allerdings zeigten die Versuche von Leppard und Everett, dass im Verlauf der Adenovirusinfektion allmähliche Veränderungen der PML-Isoformen zu erkennen sind. Demnach verursacht die Infektion mit Wildtyp-Virus, aber auch mit E1B-55kDa- und E4ORF6-Virusmutanten die starke Akkumulation einer neuen PML-Isoform. Virusmutanten, denen die E4-Proteine E4ORF1 bis E4ORF3 fehlten (*dl1-3*) zeigten dagegen keine wesentlichen Unterschiede gegenüber nicht-infizierten Zellen (Leppard und Everett, 1999). Dieses Ergebnis liefert Grund zu der Annahme, dass E4ORF3 im Gegensatz zu dem E1B-Protein oder E4ORF6 die Umstrukturierung der PML NBs durch die Modifikationen von PML steuern kann, auch wenn zu

diesem Zeitpunkt eine Beteiligung von E4ORF1 und E4ORF2 nicht völlig ausgeschlossen werden kann. Dennoch ist ein Einfluss von E4ORF1 und E4ORF2 auf PML eher unwahrscheinlich, da bislang für beide Proteine weder eine Interaktion mit PML noch die Modulation von PML NBs beschrieben wurde (zur Übersicht: Täuber und Dobner, 2001).

Obwohl seit einiger Zeit bekannt ist, dass allein E4ORF3 für die Umstrukturierung der PML NBs verantwortlich ist, sind die Mechanismen seitens des E4ORF3-Proteins, die zur Ausbildung der typischen, fadenförmigen Strukturen führen, noch völlig unbekannt. Die Vermutung, dass die Entstehung der elongierten E4ORF3-Strukturen in Analogie zu Polyubiquitin, auf eine Polymerisierung von E4ORF3-Proteinen zurückzuführen ist, basierte auf die großen Ähnlichkeiten zwischen dem E4-Protein und Ubiquitin bzw. Ubiquitin-ähnlichen Proteinen (C.2; Abb.C.3).

E4ORF3 besitzt ebenso wie einige dieser zellulären Faktoren ein Lysin und ein GG-Motiv. Nach der proteolytischen Spaltung dieses GG-Motivs durch spezifische Hydrolasen könnte in Analogie zu Ubiquitin der nun freie carboxyterminale Glycinrest von E4ORF3 in einem mehrstufigen Prozess an das Lysin eines weiteren E4ORF3-Proteins gebunden werden. Nach mehreren Runden würde daraus dann ein E4ORF3-Polymer entstehen. Die Ergebnisse der Mutationsanalysen zeigen jedoch, dass es sich nicht um einen solchen Polymerisierungsprozess unter Beteiligung des E4ORF3-Proteins handelt. Denn weder die Mutation des einzigen Lysinrests von E4ORF3 (K8R) und daher einzig möglichen E4ORF3-Konjugationsstelle noch die Zerstörung des carboxyterminalen GG-Motivs (GG97/98AA) verhindern die Ausbildung der fadenartigen E4ORF3-Strukturen. Darüber hinaus zeigt die Mutante GG/Stop, bei der der limitierende Schritt die Spaltung nach dem GG-Motiv entfällt, keine verstärkte Polymerisierung. Stattdessen unterbindet die Deletion des Carboxyterminus die Entstehung der charakteristischen E4ORF3-Strukturen und resultiert in einer punktförmigen Verteilung des viralen Proteins im Zellkern und im Zytoplasma. Die E4ORF3-Strukturen entstehen daher nicht in Folge einer Vernetzung von E4ORF3-Proteinen nach dem Prinzip der Polyubiquitinierung. Vielmehr ist eine Beteiligung anderer, zellulärer und PML NB-assoziiierter Proteine an der Ausbildung der E4ORF3-Strukturen wahrscheinlich.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen deuten darauf hin, dass p300 eine wichtige Funktion bei der Umstrukturierung der PML NBs und der Ausbildung der fadenartigen E4ORF3-Strukturen hat. So kann in der Abwesenheit von p300 in Transfektionsexperimenten lediglich eine punktförmige Verteilung von E4ORF3 beobachtet werden (C.13; Abb.C.15). Nach Expression von p300 dagegen ist E4ORF3 wieder in der Lage, die PML NBs zu reorganisieren. Dieses Ergebnis kann durch die Bindung von E4ORF3 an p300 erklärt

werden. Denn es besteht die Möglichkeit, dass durch die Interaktion mit p300 das Exportsignal von E4ORF3 maskiert und das virale Protein im Zellkern zurückgehalten wird. Fehlt hingegen p300, wie es in p300^{-/-} MEF-Zellen der Fall ist, kann eine verstärkte Akkumulation des viralen Proteins im Zytoplasma beobachtet werden. Ob p300 lediglich für die nukleäre Retention des viralen Proteins oder auch für die in der Folge ablaufenden Umstrukturierungen der PML NBs notwendig ist, muss noch geklärt werden. Im Gegensatz zu Transfektionen ist in Virus-infizierten p300^{-/-} MEF-Zellen nur eine mäßige Ausbreitung von E4ORF3 im Zytoplasma zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass im viralen Kontext für die Retention von E4ORF3 nicht nur p300, sondern wahrscheinlich auch virale Interaktionspartner erforderlich sind. So könnte beispielsweise E1B-55kDa, das mit E4ORF3 in der nukleären Matrix-Fraktion interagiert (Leppard und Everett, 1999), zur überwiegend nukleären Lokalisation von E4ORF3 beitragen.

Auch wenn die molekularen Mechanismen, die der Reorganisation der PML NBs und der Ausbildung der E4ORF3-Strukturen zu Grunde liegen, noch weitestgehend unklar sind, deutet die Assoziation von E4ORF3 mit PML NBs darauf hin, dass E4ORF3 eine wichtige Rolle bei der Regulation von Transkriptionsprozessen spielt. Denn PML NBs, welche wichtige Zielstrukturen von E4ORF3 darstellen, werden mit Transkriptionsvorgängen in Verbindung gebracht und als Orte aktiver Transkription beschrieben. Zwar enthalten diese Strukturen keine allgemeinen Transkriptionsfaktoren, dafür aber laut neueren Studien naszierende RNA-Transkripte (Grande *et al.*, 1996; LaMorte *et al.*, 1998; Melnick und Licht, 1999). Daneben konnten in diesen PML-Strukturen Transkriptionskofaktoren wie Rb, p300/CBP und p53 nachgewiesen werden. Da dies allerdings meist nur nach Koexpression von onkogenem Ras beobachtet worden ist, wird in der Literatur noch immer diskutiert, ob eine Lokalisation von Rb, p300/CBP und p53 in den PML NBs auch unabhängig von Ras erfolgen kann (LaMorte *et al.*, 1998; Doucas *et al.*, 1999; Pearson *et al.*, 2000; Ferbeyre *et al.*, 2000). Ähnlich wie Ras ist auch E4ORF3 in der Lage p300 in fadenartigen PML-Strukturen rekrutieren, wo es zusammen mit p300 kolokalisiert. Dies ist wahrscheinlich auf die direkte Interaktion von E4ORF3 mit p300 zurückzuführen (Täuber, 2002; Abb.C.12 und Abb.C.13). Diese Wechselwirkung und die Regulation des Transkriptionskoaktivators p300 sprechen für eine Beteiligung von E4ORF3 an Transkriptionsvorgängen. Dies wird noch weiter verdeutlicht durch die Tatsache, dass in Reporterversuchen E4ORF3 die transaktivierenden Eigenschaften von p300 inhibiert (Täuber, 2002). Eine Ursache hierfür könnte in der spezifischen Inhibierung der Histonazetylierung durch HAT-Enzyme liegen, die eine Auflockerung der Chromatinstruktur und damit die Transkription insgesamt verhindert.

Aufschluss über die genauen Funktionen von E4ORF3 könnte die Identifizierung von p53 als neuen Interaktionspartners von E4ORF3 geben. Im Rahmen dieser Arbeit ist es mit Hilfe von Immunpräzipitationsanalysen gelungen zu zeigen, dass E4ORF3 *in vivo* an p53 bindet. Gleichzeitig konnte nachgewiesen werden, dass diese Interaktion zu einer Inhibierung der p53-Azetylierung wahrscheinlich durch endogene HAT-Enzyme führt (C.16; Abb.C.19). Auf diese Weise hat das E4ORF3-Protein durch die Bindung an p53 vielleicht die Möglichkeit, die Transkription bestimmter Gene zu regulieren.

Die Frage jedoch, inwieweit die Inhibierung der Azetylierung von p53 durch E4ORF3 den E1B-55kDa/ E4ORF6-vermittelten Abbau von p53 beeinflusst, muss in weiterführenden Experimenten geklärt werden. Li und Kollegen konnten zeigen, dass durch die Azetylierung von p53 dessen Mdm2-abhängige Ubiquitinylierung *in vivo* verhindert wird und zwar nicht nur an azetylierten, sondern auch an nicht-azetylierten Lysinresten (Li *et al.*, 2002). Der Tumorsuppressor p53 wird an mehreren Lysinresten im Carboxyterminus durch p300/CBP und in einem geringeren Maße durch P/CAF (Appella und Anderson, 2001) azetyliert. Die Azetylierungsstellen innerhalb von p53 sind nicht nur wichtig für dessen Ubiquitinylierung und anschließende Degradierung, sondern erlauben dadurch auch die Interaktion mit Transkriptionskoaktivatoren p300/CBP und P/CAF. Aus diesem Grund spielt die p53-Azetylierung eine entscheidende Rolle bei der effizienten Rekrutierung dieser Komplexe zu bestimmten Promotorregionen und der Aktivierung von p53-kontrollierten Genen *in vivo* (Barlev *et al.*, 2001). E4ORF3 könnte demnach sowohl indirekt auf die Stabilität von p53 als auch auf die p53-vermittelte Transkriptionsaktivierung Einfluss nehmen. Demnach besitzen Adenoviren mehrere Faktoren, die in der Lage sind, welche die p53-Funktionen regulieren können.

Betrachtet man die Vorgänge während der frühen Phase der lytischen Infektion, so zeigt sich, dass E4ORF3 ebenso wie das E4ORF6-Protein für die nukleäre Lokalisation von E1B-55kDa verantwortlich ist (Goodrum und Ornelles, 1997; König *et al.*, 1999). P53, das in normalen Zellen eine vorzugsweise zytoplasmatische Verteilung aufweist (Dippold *et al.*, 1981; Rotter *et al.*, 1983), kolokalisiert in Abwesenheit der aller Ad5 E4-Proteine mit E1B-55kDa (König *et al.*, 1999). Ist jedoch nur E4ORF3 vorhanden, gelangt das E1B-Protein zu den PML NBs, wo es mit E4ORF3 und PML kolokalisiert. Da überdies eine direkte Interaktion der beiden viralen Proteine in diesen Strukturen von Leppard und Everett nachgewiesen werden konnte (Leppard und Everett, 2001), besteht die Möglichkeit, dass das E4-Protein, nicht nur E1B-55kDa, sondern damit auch p53 in diese nukleären Strukturen rekrutieren kann. Daneben gibt es sicherlich noch weitere Möglichkeiten, wie p53 in die PML NBs gelangt.

Denn die Überexpression von PML führt beispielsweise zur Rekrutierung von p53 in die PML NBs, erhöht die Transkriptionsraten von p53-abhängigen Zielgenen und fördert den p53-vermittelten Zellzyklusarrest (Bischof *et al.*, 2002; Ferbeyre *et al.*, 2000; Fogal *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2000; Pearson *et al.*, 2000). Umgekehrt spielt p53 auch eine wichtige Rolle bei der Induktion von PML durch Onkogene und in Folge von DNA-Schäden (Stanchina *et al.*, 2004). Da in diesen nukleären Strukturen auch HAT-Enzyme (p300/CBP) (LaMorte *et al.*, 1998; Doucas *et al.*, 1999; Täuber, 2002) und HDACs (Fortunato und Spector, 1998; Zimmer *et al.*, 2004) vorhanden sind, stellen PML NBs die idealen Strukturen für die Regulation der p53-Azetylierung dar. Neben E1B-55kDa, das durch die Interaktion mit P/CAF die Azetylierung von p53 inhibiert (Liu *et al.*, 2000), ist auch das E4ORF3-Protein wahrscheinlich über die Wechselwirkung mit p300 (und anderen HAT-Enzymen) dazu fähig, diese Modifizierung von p53 zu beeinflussen. Inwieweit die Inhibition der Azetylierung eine Voraussetzung für den E1B/E4ORF6-abhängigen proteasomalen Abbau von p53 darstellt, werden zukünftige Experimente zeigen müssen. Darüber hinaus kann die Adenovirus-vermittelte Inhibition der p53-Azetylierung einen Mechanismus darstellen, um zelluläre und virale Transkriptionsvorgänge genauestens zu regulieren. Die fehlende Azetylierung von p53 führt keineswegs zum völligen Abschalten der Transkription, sondern resultiert lediglich in einer verminderten Affinität von p53 zu DNA (Sakaguchi *et al.*, 1998; Lill *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 1997; Avantaggiati *et al.*, 1997; Barlev *et al.*, 2001; Espinosa *et al.*, 2001). Es besteht daher die Möglichkeit, dass p53 die Expression bestimmter wachstumstimulatorischer und anti-apoptotischer Genprodukte erlaubt, wie es bereits in analoger Weise für den Tumorsuppressor p21 gezeigt wurde (Chang *et al.*, 2000; Perkins, 2002). In der späten Phase der Adenovirus-Infektion befindet sich p53 in Abwesenheit von E4ORF6 in der Mitte der viralen Replikationszentren, während E1B-55kDa an der Peripherie dieser viralen Strukturen zu finden ist (König *et al.*, 1999). Es stellt sich die Frage, ob p53 innerhalb dieser Zentren vielleicht wichtige Funktionen übernimmt. Denn Herpesviren, die ebenfalls p53 in ihren Replikationszentren akkumulieren (Zhong und Hayward, 1997; Fortunato und Spector, 1998), haben keinen Mechanismus entwickelt, p53 zu eliminieren. Dieser positive Einfluss von p53 könnte bei Adenoviren aber auch zeitlich begrenzt sein, da in der späten Phase der Infektion p53 mit Hilfe von E1B-55kDa und E4ORF6 dem proteasomalen Abbau unterzogen wird (Harada *et al.*, 2002; Querido *et al.*, 1997; Querido *et al.*, 2001; Roth *et al.*, 1998; Steegenga *et al.*, 1998). Dem E1B-Protein wird dabei eine wichtige Aufgabe zuteil. Denn *in vitro* verstärkt es durch die Bindung von p53 dessen Assoziation mit dem E4ORF6-E3-Ligase-Komplex. Dies ist für die optimale Ubiquitylierung und anschließende Degradierung von p53 erforderlich. In Ab-

wesenheit von E1B-55kDa wird das p53-Protein wesentlich weniger effizient zu diesem Komplex rekrutiert und in der Folge abgebaut (Blanchette *et al.*, 2004). Interessanterweise scheint diese Komplexbildung auch zur Stabilisierung von E1B-55kDa und E4ORF6 beizutragen. Fehlt beispielsweise eines dieser beiden Proteine oder ist aufgrund von Mutationen eine direkte Interaktion von E1B-55kDa und E4ORF6 nicht möglich, könnte es demzufolge zu einer Destabilisierung dieser beiden viralen Proteine oder sogar des gesamten Komplexes kommen. Denn noch unveröffentlichte Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass E1B-Virusmutanten, deren E1B-kDa-Proteine nicht mehr an E4ORF6 binden, eine Reduktion in den E4ORF6-Gleichgewichtsmengen aufweisen. Möglicherweise bildet das E4ORF3-Protein durch die Umstrukturierung der PML NBs oder auch durch seinen direkten Einfluss auf die Modifikation von p53 die notwendige Voraussetzung für die E1B-55kDa-abhängige Sequestrierung von p53 zu dem E4ORF6-E3-Ligasekomplex. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass E4ORF3 durch die Interaktion mit p300 und p53 auch Transkriptionsvorgänge am eigenen E4-Promotor reguliert. Denn wie E1A 13S könnte es zu einer Aktivierung dieser Transkriptionseinheit führen (zur Übersicht: Akusjärvi, 1993) innerhalb des E4ORF3-Proteins verhindern möglicherweise die Aktivierung der Transkription vom E4-Promotor aus und könnten die Ursache für die kaum nachweisbaren E4ORF3-Mengen sein, die in Transfektionsexperimenten die gleichen Gleichgewichtsmengen zeigen wie das Wildtyp-Protein (Abb.C.4). Neben der Regulation von (p53-abhängigen) Transkriptionsvorgängen hat E4ORF3 auch einen wesentlichen Einfluss auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen. Durch die Modulation des Mre11/NBS1/Rad50 (MRN)-Komplexes ist E4ORF3 in der Lage, die Konkatemerisierung adenoviraler Genome zu blockieren. Durch die Reorganisation der MRN-Komponenten wird womöglich die Detektion der Enden der linearen, doppelsträngigen adenoviralen Genome und deren „Reparatur“ durch die MRN-Komponenten verhindert (Evans und Hearing, 2004). Dieser zelluläre MRN-Komplex, der in nicht-infizierten Zellen eine diffuse nukleäre Verteilung aufweist, ist in Anwesenheit von E4ORF3 sowohl im Zytoplasma als auch in PML-haltigen nukleären Strukturen zu finden (Stracker *et al.*, 2002; Araujo *et al.*, 2005). Vielleicht werden in Analogie zu p53 einzelne Komponenten dieses Komplexes durch die Assoziation mit den PML NBs in einer E4ORF3-abhängigen Weise auf den proteasomalen Abbau durch E1B-55kDa und E4ORF6 vorbereitet (Stracker *et al.*, 2002; Blanchette *et al.*, 2004). Laut Evans und Hearing ist jedoch die PML NB-Umstrukturierung durch E4ORF3 keineswegs für die Reorganisation von MRN-Komponenten erforderlich (Evans und Hearing, 2005). Dennoch spielt E4ORF3 möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Destabilisierung von MRN-Komponenten, indem es zu einer Steigerung des proteasomalen Abbaus von Mre11 und

vielleicht auch anderen Komponenten beiträgt. Dies kann neuesten Erkenntnissen zufolge auf die E4ORF3-vermittelte Rekrutierung von Mre11 in die so genannten Aggresome im Zytoplasma zurückzuführen sein. Es wird angenommen, dass missgefaltete Proteine ubiquitinyliert werden und in der Folge Aggregate an Mikrotubuli ausbilden, die in einer retrograden Weise zu den mit Proteasomen angereicherten Zentrosomen transportiert werden (Ajajuro *et al.*, 2005). Auch wenn die Ausbildung von Aggresomen in erster Linie durch missgefaltete Proteine hervorgerufen wird, besteht die Möglichkeit, dass sich Viren dieser Strukturen bedienen. Es gibt einige Beispiele von Viren, die sich für den Zusammenbau von Nachkommen-viren dieser Aggresomen-ähnlichen Strukturen bedienen (Saavedra *et al.*, 1997; Nozawa *et al.*, 2004). So konnte auch bei Überexpression von Ad2 und Ad5 E1B-55kDa in transformierten Zellen die Entstehung von Aggresomen und die Sequestrierung von p53 in diese Strukturen beobachtet werden (Zantema *et al.*, 1985; Blair Zajdel und Blair, 1988). Ob diese zytoplasmatischen Aggregate für Transformationsvorgänge benötigt werden, ist allerdings noch unklar (van den Heuvel *et al.*, 1990; Endter *et al.*, 2005). Bekannt dagegen ist, dass die Relokalisation des MRN-Komplexes durch E4ORF3 die Konkatemerisierung der Ad Genome verhindert (Stracker *et al.*, 2002).

Somit verfügt Ad5 über mehrere Proteine, welche die antiviralen Mechanismen der Wirtszelle mit Hilfe unterschiedlicher Strategien ausschalten. Insbesondere das E4ORF3-Protein trägt durch die Reorganisation von nukleären Strukturen und Komplexen zur Virusreplikation und zur Inaktivierung von antiviralen Maßnahmen bei. Die Untersuchungen jedoch zeigen die Schwierigkeiten auf, die Funktionen der einzelnen adenoviralen Proteine im Viruskontext zu untersuchen. Die hohe Redundanz zwischen den Funktionen verschiedener viraler Faktoren machen es nahezu unmöglich durch Mutationen innerhalb einzelner Gene signifikante Effekte zu beobachten. Einen wichtigen Ansatzpunkt bilden daher weniger komplexe Systeme, die zwar stark vereinfacht und den Interaktionen zwischen den adenoviralen Faktoren weniger Beachtung schenken, aber dafür erste Einblicke gewähren.

D.7 Mechanismen der Ad5 E4ORF3-vermittelten Transformation

Nach heutigem Kenntnisstand handelt es sich bei der Adenovirus-vermittelten Zelltransformation um einen mehrstufigen Prozess. Die Genprodukte der frühen Transkriptionseinheit E1A und E1B sind dabei für die Initiation und Manifestierung der voll-

ständigen Transformation primärer Zellen ausreichend. Denn sowohl E1A als auch E1B können gezielt die Funktionen verschiedener wachstumsregulatorischer Proteine, welche wichtige Aufgaben bei der Zellzykluskontrolle und bei der Apoptose innehaben, manipulieren. Nach einem stark vereinfachten Modell induzieren die E1A-Proteine die Immortalisierung primärer Zellen, während die E1B-Genprodukte für die Progression und Manifestierung der Zelltransformation erforderlich sind. Deshalb wurde das transformierende Potenzial der Adenoviren lange Zeit allein der frühen E1-Region zugeschrieben. Vor kurzem durchgeführte Studien belegen aber, dass die beiden Ad5 E4-Genprodukte E4ORF3 und E4ORF6 in der Lage sind, primäre Rattennierenzellen in Kooperation mit Ad5 E1 oder mit Ad5 E1A vollständig zu transformieren (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997a; Nevels *et al.*, 1999a) und wichtige E1B-Funktionen im Kontext mit E1A zu ersetzen. Diese Beobachtungen unterstützen die These, dass das onkogene Potenzial humaner Adenoviren nicht allein von E1A- und E1B-Proteinen abhängig ist.

Obwohl E4ORF3 und E4ORF6 einige redundante Funktionen gegenüber der E1B-Region besitzen, weist der E1A/E4-vermittelte Transformationsvorgang doch wesentliche Unterschiede zur klassischen E1-Transformation auf (Nevels *et al.*, 2001; Täuber, 2002). Für die onkogene Transformation primärer Zellen ist eine lediglich transiente Expression von E1A und E4ORF3 oder E4ORF6 völlig ausreichend. Es wird daher angenommen, dass die vorübergehende Expression viraler Proteine und/oder Integration viraler Gensequenzen ausreicht, um Mutationen im Genom der Wirtszelle („*hit*“) zu induzieren. Der dadurch veränderte Genotyp der Wirtszelle führt schließlich selbst nach dem Verlust der viralen Gensequenzen („*run*“) zur vollständigen Zelltransformation.

Über die molekularen Grundlagen der E1A/E4-vermittelten „*hit & run*“-Transformation kann derzeit nur spekuliert werden. Eine mögliche Erklärung liefert die Beobachtung, dass beide E4-Proteine mutagene Eigenschaften besitzen (Nevels *et al.*, 2001). Die Akkumulation von Mutationen ist wahrscheinlich auf das Zusammenwirken verschiedener Faktoren zurückzuführen. Neben E1A, das den unfahrplanmäßigen Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus bewirkt, sind auch die beiden E4-Proteine aufgrund der Modulation zellulärer Regulatoren der Genexpression, der Apoptose und der DNA-Reparatur an der Entstehung von Mutationen beteiligt. Durch die Interaktion der beide E4-Proteine mit zellulären Reparaturenzymen (DNA PK, MRN-Komplex) und deren Modulation wird die Konkatemisierung adenoviraler Genome verhindert und dadurch die Funktion der zellulären Reparatursysteme, die als wichtige Sensoren für DNA-Schäden fungieren, wirksam blockiert (Boyer *et al.*, 1999; Evans und Hearing, 2004). Stracker und Kollegen demonstrierten außerdem, dass E4ORF6 zusammen mit

E1B-55kDa den Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Abbau von Mre11 (und Rad50) begünstigt und dadurch die MRN-Funktionen auf unterschiedliche, aber redundante Weise wie E4ORF3 manipuliert (Stracker *et al.*, 2002).

Die genaue Analyse verschiedener Virusmutanten verdeutlicht, dass die Modulation von PML NBs unabhängig von der Reorganisation des MRN-Komplexes erfolgt. Denn die E4ORF3-Mutante DL105/106AA ist zwar nach wie vor in der Lage, PML NBs zu reorganisieren, hat jedoch keinerlei Einfluss auf die Lokalisation der MRN-Komponenten. Diese Virusmutante zeigte in der Virusmehrung ähnlich starke Defekte wie die beiden E4ORF3-Varianten N82A und L103A, die weder PML NBs noch den MRN-Komplex modulieren können. Diese Ergebnisse führen daher zu der Annahme, dass die Modulation des zellulären MRN-Komplexes die notwendige Voraussetzung für eine effiziente virale DNA-Replikation bildet (Evans und Hearing, 2005). In der Transformation dagegen haben diese E4ORF3-Mutanten in Kooperation mit der E1-Region sehr unterschiedliche Effekte auf die *Focus*-Bildung. Während die Mutante L106A ein hohes transformierendes Potenzial besitzt, hat die Mutante L103A einen moderaten Einfluss auf die Transformation. Die E4ORF3-Mutante N82A führt sogar zu einer deutlichen Reduktion der Anzahl der *Foci* (Abb.C.20). Dies verdeutlicht, dass die Modulation von zellulären DNA-Reparationsenzymen durch E4ORF3 allein nicht ausreicht, um die mutagenen Eigenschaften des E4-Proteins vollständig zu erklären. Vielmehr beweist die E4ORF3-Mutante GG97/98AA, dass eine hohe Mutationsrate in CHO-Zellen keineswegs genügt, um in Kooperation mit Ad5 E1A oder E1 automatisch ein hohes transformierendes Potenzial zu erzielen. Einen genau gegenläufigen Effekt kann man zudem nach Deletion des Carboxyterminus von E4ORF3 (GG/Stopp) oder nach Mutation von Leucin¹⁰³ beobachten. Denn trotz einer geringen Anzahl induzierter Mutationen in CHO-Zellen, ist bei den entsprechenden E4ORF3-Proteinen eine hohe Transformationsaktivität in Kooperation mit E1A oder E1 in Rattennierenzellen erkennbar (Abb.C.20 und Abb.C.21).

Eine andere mögliche Erklärung ergibt sich aus der Tatsache, dass alle viralen Proteine, die bislang mit „*hit & run*“-Transformation in Verbindung gebracht wurden (SV40 TAg, HCMV IE1 und IE2) mit PML NBs assoziiert sind (Carvalho *et al.*, 1995; Ewald *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1997). Da auch E4ORF3 in diesen nukleären Strukturen zu finden ist und die Integrität der PML NBs verändert (Carvalho *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996; Täuber, 2002), liegt die Vermutung nahe, dass ein Zusammenhang zwischen diesen subzellulären Kompartimenten und der E4ORF3-induzierten Mutagenese und Transformation besteht. Dennoch scheint die Modulation der PML NBs ebenfalls nicht die einzige Ursache des transformierenden Potenzials von E4ORF3 zu sein, da auch die carboxyterminale Variante E4ORF3 L103A, die weder eine Ko-

lokalisierung mit PML NBs zeigt noch eine Umstrukturierung dieser nukleären Domänen bewirkt, zu einer hohen *Focus*-Bildung in primären Rattennierenzellen beitragen kann.

Obwohl E4ORF3 auch in stabil transformierten Rattennierenzellen mit PML in diskreten Strukturen kolokalisiert, konnte bislang noch keine direkte Wechselwirkung zwischen dem viralen E4-Protein und dem Tumorsuppressor nachgewiesen werden (König *et al.*, 1999; Nevels *et al.*, 1999b). Darüber hinaus kann E4ORF3 nicht der PML-induzierten Repression der E1-vermittelten *Focus*-Bildung entgegenwirken und sie aufheben (Nevels *et al.*, 1999b). Trotzdem gibt es deutliche Hinweise, dass die transformierenden Eigenschaften von E4ORF3 zumindest teilweise auf die Wechselwirkung(en) mit PML NB-assoziierten Faktoren zurückzuführen sind. In diesem Zusammenhang könnte die Interaktion von E4ORF3 mit p300, das als Transkriptionskoaktivator und HAT-Enzym wirkt, eine wichtige Rolle spielen. Denn durch die negative Regulation von p300 wird möglicherweise nicht nur die Azetylierung von Histonen, sondern auch die des Tumorsuppressors p53 unterbunden. Das hat zur Folge, dass wichtige p53-Funktionen wie die Einleitung der Apoptose und des Zellzyklusarrests als Reaktion auf DNA-Schäden und andere externe Stimuli nicht mehr ausgeübt werden können. Die entsprechende Konsequenz dieser E4ORF3-Wirkung ist schließlich die weitere Anhäufung von Mutationen. Dies würde erklären, warum E4ORF3 ebenso wie E4ORF6, das in Kooperation mit E1B-55kDa den proteasomalen Abbau von p53 vermittelt, zusammen mit der E1-Region oder E1A zu einer Erhöhung der *Focus*-Bildung führen kann.

Die Beobachtungen dieser Arbeit zeigen, dass Mutationen innerhalb von E4ORF3, die eine verstärkte Azetylierung von p53 mit sich bringen (K8R), einen deutlichen Rückgang der Transformationsrate bewirken. Selbst in Abwesenheit von E1B gelingt es E4ORF3, die Transformation von primären Rattennierenzellen signifikant zu erhöhen. Eine mögliche Erklärung liefert die Tatsache, dass E4ORF3 auch Funktionen von E1B-55kDa ersetzt (Liu *et al.*, 2000). Denn frühere Untersuchungen zeigen, dass auch E1B die Azetylierung von p53 blockieren kann. Dies führt zu der Annahme, dass E4ORF3 in Analogie zu E1B-55kDa einen ähnlichen Einfluss auf die Aktivierung von p53 hat, indem das Wildtyp-Protein die Azetylierung von p53 moduliert.

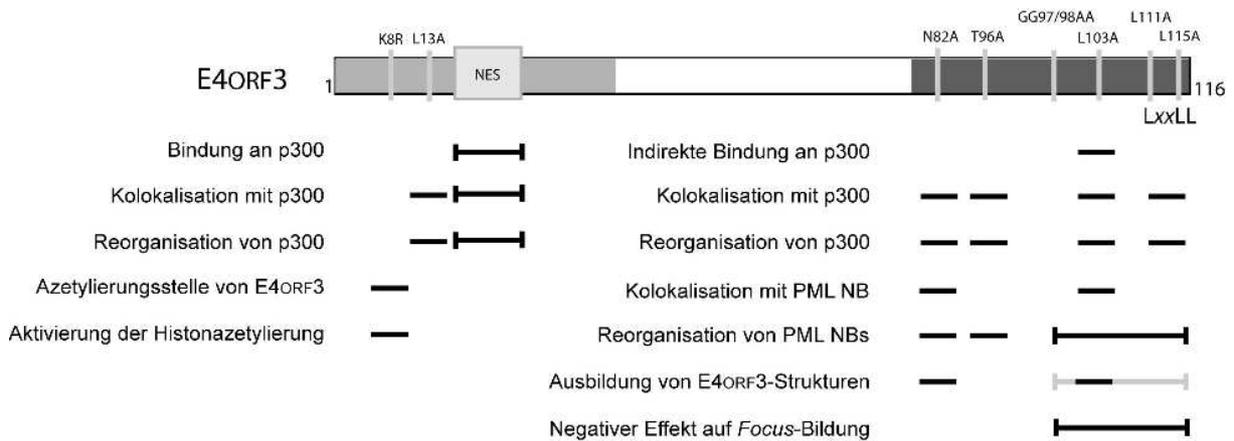


Abb.D.4: Die funktionellen Domänen von Ad5 E4ORF3

Dargestellt ist der aminoternale, zentrale und carboxyterminale Bereich des E4ORF3-Polypeptids. Mutationen im äußersten Carboxyterminus (GG/Stopp, L103A, L106A, L111A, L115A) resultieren in einem Anstieg der *Focus*-Bildung in Kooperation mit der E1-Region, während Veränderungen in der aminoterminalen Region (dunkelgrau; K8R und L13A) einen Verlust des transformierenden Potenzials von E4ORF3 bewirken. Die Ausbildung der charakteristischen fadenartigen Strukturen im Zellkern wird neben L103A auch durch N82A und durch die Deletion des Carboxyterminus (GG/Stopp) verhindert. Der gesamte Carboxyterminus (dunkelgrau) hat eine wichtige Funktion bei der Wechselwirkung mit PML NB-Komponenten. Dieser ist nämlich in der Lage, sowohl die Reorganisation als auch die Kolokalisation mit PML NBs und p300 zu vermitteln. Darüber hinaus übernimmt auch der Aminoterminus (K8R, L13A, NES) wichtige Aufgaben bei der Interaktion mit der Histonazetyltransferase p300. Das E4ORF3-Protein wird in dieser Region am einzigen Lysinrest azetyliert und beeinflusst darüber hinaus die Azetylierung von Histon-Proteinen und dem Tumorsuppressor p53. Die für die beschriebenen Funktionen angegebenen Abschnitte sind als durchgehende Linien dargestellt. Die Zahlen in der schematischen Darstellung von E4ORF3 geben die Positionen der Aminosäuren an. LXXLL: putatives Hormonrezeptor-Bindemotiv; NES: nukleäres Exportsignal.

D.8 Ausblick

Seit mehr als einem Jahrzehnt konzentrieren sich die Forschungstätigen an humanen Adenoviren überwiegend auf ihre Anwendung als Vektorsystem zur Behandlung von Tumorerkrankungen. Im Mittelpunkt des Interesses stehen dabei replikationsdefekte Adenoviren der ersten und der zweiten Generation, die Deletionen in der E1- bzw. in der E1/E4-Region aufweisen. Darüber hinaus werden seit einigen Jahren auch konditionell replikationskompetente Virusmutanten untersucht. Diese Gruppe adenoviraler Vektoren umfasst bedingt vermehrungsfähige Viren, welche die E1A/E1B und E4-Transkriptionseinheiten entweder komplett oder nur teilweise enthalten. Weiterhin zeichnen sie sich aufgrund genetischer Veränderungen in den Kontrollregionen und/oder kodierenden Bereichen der *E1a*- und *E1b*-Gensequenzen durch die Eigenschaft aus, selektiv in bestimmten Tumorzellen zu replizieren (zur Übersicht: Alemany *et al.*, 2000; Gomez-Navarro und Curiel, 2000). Der derzeit prominenteste Vertreter dieser Vektorgruppe ist die E1B-55kDa-defiziente Virusmutante, die als

dl1520 oder ONYX-015 bezeichnet wird (Barker und Berk, 1987; Bischoff *et al.*, 1996). Trotz seines großen Anwendungsmöglichkeiten in der Gen- und Tumorthherapie wird der breite Einsatz dieser Vektoren noch immer kontrovers diskutiert (Alemany *et al.*, 2000). Da ONYX-015 nur in den Tumorzellen replizieren soll, die kein funktionelles p53-Protein besitzen, könnte ONYX-015 ein wirksames Mittel gegen maligne Tumorerkrankungen darstellen (Dix *et al.*, 2001). In der Zwischenzeit mehren sich jedoch die Zweifel, dass die selektive Replikation von ONYX-015 tatsächlich vom p53-Status der Zelle abhängig ist. Denn es gibt mittlerweile eine Reihe von Studien, die belegen, dass die Unterschiede bei der Effizienz der viralen Replikation des ONYX-015 in erster Linie auf die unterschiedliche Permissivität verschiedener primärer Zellen oder Tumorzelllinien zurückzuführen ist (Goodrum und Ornelles, 1998; Rothmann *et al.*, 1998; Harada und Berk, 1999; Steegenga *et al.*, 1999; Turnell *et al.*, 1999). Darüber hinaus konnten Rothmann und Kollegen zeigen, dass die Replikation von ONYX-015 auch in Anwesenheit des Tumorsuppressorproteins p53 möglich ist (Rothmann *et al.*, 1998). Neuesten Erkenntnissen zufolge ist die Tumorspezifität von ONYX-015 nicht von der Inaktivierung von p53, sondern vom nukleozytoplasmatischen Transport später viraler RNA-Transkripte abhängig (O'Shea *et al.*, 2004). Nach Infektion primärer humaner Epithelzellen mit ONYX-015, die Wildtyp-p53 enthalten, konnte nämlich eine Stabilisierung von p53 beobachtet werden. Interessanterweise war der Tumorsuppressor in diesen Zellen weder transkriptionell aktiv noch konnte er Apoptose induzieren (O'Shea *et al.*, 2004). Dies deutet darauf hin, dass andere virale Faktoren für die Inaktivierung von p53 verantwortlich sind. Möglicherweise handelt es sich hierbei um ein Protein aus der E4-Region. Wie die Ergebnisse dieser Doktorarbeit vermuten lassen, könnte dabei sogar dem E4ORF3-Protein eine wichtige Aufgabe zuteil werden. Einerseits durch den indirekten Einfluss auf zelluläre Transkriptionsvorgänge durch die Inhibierung der Histonazetylierung, andererseits durch die Inaktivierung des Tumorsuppressors selbst, indem E4ORF3 dessen Azetylierung verhindert. Auf diese Weise könnte das E4-Protein zur Replikation von ONYX-015 in Tumorzellen mit Wildtyp-p53 beitragen, indem es die Funktion des E1B-55kDa-Proteins, der E1A-induzierten Stabilisierung von p53 entgegenzuwirken, übernimmt. Kritisch muss jedoch in diesem Zusammenhang die Fähigkeit der E1A- und E4-Genprodukte zur „hit & run“-Transformation betrachtet werden (Nevels *et al.*, 2001). Da im Falle der „hit & run“-Transformation Adenoviren in die Tumorgenese eingreifen können, ohne dass die viralen Gensequenzen in den transformierten Zellen persistieren, ist es nahezu unmöglich einen direkten Zusammenhang zwischen Adenovirus-Infektion und Tumorentstehung herzustellen. Gerade aber wegen des zunehmenden Einsatzes

humaner Adenoviren in der Tumorthherapie (Alemany *et al.*, 2000) und als Vektorsystem in der somatischen Gentherapie (zur Übersicht: Benihoud *et al.*, 1999) stellt das onkogene und mutagene Potenzial von E4ORF6 und E4ORF3 ein erhöhtes Sicherheitsrisiko dar. Aus diesem Grunde wurde bereits empfohlen, die E4-Region aus allen adenoviralen Vektoren zu entfernen (Täuber und Dobner, 2001). Die bisherigen viel versprechenden Ergebnisse von ONYX-015 aus den klinischen Studien der Phase I und II zur Behandlung von Tumorerkrankungen (Heise *et al.*, 1999; Heise *et al.*, 2000; Khuri *et al.*, 2000; Nemunaitis *et al.*, 2000; Kirn, 2001), sollen nicht darüber hinwegtäuschen, dass die molekularen Grundlagen für die Wirkungsweise von ONYX-015 noch weitestgehend unklar sind (zur Übersicht: Dix *et al.*, 2001). Bei der gegenwärtigen und zukünftigen Forschung sollte daher auch ein besonderes Augenmerk auf die Analyse der E4-Region gelegt werden. Bisherigen Ergebnissen zufolge können durch gezielte Aminosäureaustausche am Aminoterminus und im zentralen Bereich des E4ORF3-Proteins die Transformationsraten in primären Rattenzellen deutlich gesenkt werden. Ausgehend von diesen Erkenntnissen könnten dann gezielt Adenovirus-Doppelmutanten (E1B-55kDa und E4ORF3) entwickelt werden, die für die Behandlung von humanen Tumorerkrankungen eingesetzt werden können, ohne dass das Risiko von Adenovirus-induzierten Transformation eingegangen werden muss. Erst dann stellen adenovirale Vektoren effiziente und sichere Systeme für einen Einsatz in der Tumorthherapie dar.

Literaturverzeichnis

- Ahn, J.-H., and Hayward, G. S. (1997). The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. *J Virol* *71*, 4599-4613.
- Ahn, J. H., Brignole, E. J., 3rd, and Hayward, G. S. (1998). Disruption of PML subnuclear domains by the acidic IE1 protein of human cytomegalovirus is mediated through interaction with PML and may modulate a RING finger-dependent cryptic transactivator function of PML. *Mol Cell Biol* *18*, 4899-4913.
- Ait-Si-Ali, S., Poleskaya, A., Filleur, S., Ferreira, R., Duquet, A., Robin, P., Vervish, A., Trouche, D., Cabon, F., and Harel-Bellan, A. (2000). CBP/p300 histone acetyl-transferase activity is important for the G1/S transition. *Oncogene* *19*, 2430-2437.
- Ait-Si-Ali, S., Ramirez, S., Barre, F. X., Dkhissi, F., Magnaghi-Jaulin, L., Girault, J. A., Robin, P., Knibiehler, M., Pritchard, L. L., Ducommun, B., *et al.* (1998). Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle-dependent kinases and oncoprotein E1A. *Nature* *396*, 184-186.
- Akusjärvi, G. (1993). Proteins with transcription regulatory properties encoded by human adenoviruses. *Trends Microbiol* *1*, 163-170.
- Alcalay, M., Tomassoni, L., Colombo, E., Stoldt, S., Grignani, F., Fagioli, M., Szekely, L., Helin, K., and Pelicci, P. G. (1998). The promyelocytic leukemia gene product (PML) forms stable complexes with the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* *18*, 1084-1093.
- Aleman, R., Balagué, C., and Curiel, D. T. (2000). Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotech* *18*, 723-727.
- Alland, L., Muhle, R., Hou, H., Jr., Potes, J., Chin, L., Schreiber-Agus, N., and DePinho, R. A. (1997). Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* *387*, 49-55.
- Allfrey, V. G., Faulkner, R., and Mirsky, A. E. (1964). Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *51*, 786-794.
- Altabef, M., Garcia, M., Lavau, C., Bae, S. C., Dejean, A., and Samarut, J. (1996). A retrovirus carrying the promyelocyte-retinoic acid receptor PML-RARalpha fusion gene transforms haematopoietic progenitors in vitro and induces acute leukaemias. *Embo J* *15*, 2707-2716.
- Ankerst, J., and Jonsson, N. (1989). Adenovirus type 9-induced tumorigenesis in the rat mammary gland related to sex hormonal state. *J Natl Cancer Inst* *81*, 294-298.
- Ankerst, J., Jonsson, N., Kjellen, L., Norrby, E., and 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., and 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.
- Appella, E., and Anderson, C. W. (2001). Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* *268*, 2764-2772.

- Arany, Z., Newsome, D., Oldread, E., Livingston, D. M., and Eckner, R. (1995). A family of transcriptional adaptor proteins targeted by the E1A oncoprotein. *Nature* 374, 81-84.
- Arany, Z., Sellers, W. R., Livingston, D. M., and Eckner, R. (1994). E1A-associated p300 and CREB-associated CBP belong to a conserved family of coactivators. *Cell* 77, 799-800.
- Araujo, F. D., Stracker, T. H., Carson, C. T., Lee, D. V., and Weitzman, M. D. (2005). Adenovirus type 5 E4orf3 protein targets the Mre11 complex to cytoplasmic aggresomes. *J Virol* 79, 11382-11391.
- Armentano, D., Zabner, J., Sacks, C., Sookdeo, C. C., Smith, M. P., St. George, J. A., Wadsworth, S. C., Smith, A. E., and Gregory, R. J. (1997). Effect of the E4 region on the persistence of transgene expression from adenovirus vectors. *J Virol* 71, 2408-2416.
- Ascoli, C. A., and Maul, G. G. (1991). Identification of a novel nuclear domain. *J Cell Biol* 112, 785-795.
- Avantaggiati, M. L., Ogryzko, V., Gardner, K., Giordano, A., Levine, A. S., and Kelly, K. (1997). Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* 89, 1175-1184.
- Bagchi, S., Raychaudhuri, P., and Nevins, J. R. (1990). Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation. *Cell* 62, 659-669.
- Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1995). CBP-induced stimulation of c-Fos activity is abrogated by E1A. *Embo J* 14, 4758-4762.
- Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384, 641-643.
- Bannister, A. J., Oehler, T., Wilhelm, D., Angel, P., and Kouzarides, T. (1995). Stimulation of c-Jun activity by CBP: c-Jun residues Ser63/73 are required for CBP induced stimulation in vivo and CBP binding in vitro. *Oncogene* 11, 2509-2514.
- Barbanti-Brodano, G., Sabbioni, S., Martini, F., Negrini, M., Corallini, A., and Tognon, M. (2004). Simian virus 40 infection in humans and association with human diseases: results and hypotheses. *Virology* 318, 1-9.
- Barber, G. N. (2001). Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ* 8, 113-126.
- Barker, D. D., and Berk, A. J. (1987). Adenovirus proteins from both E1B reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection. *Virology* 156, 107-121.
- Barlev, N. A., Liu, L., Chehab, N. H., Mansfield, K., Harris, K. G., Halazonetis, T. D., and Berger, S. L. (2001). Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell* 8, 1243-1254.
- Bell, P., Lieberman, P. M., and Maul, G. G. (2000). Lytic but not latent replication of Epstein-Barr virus is associated with PML and induces sequential release of nuclear domain 10 proteins. *J Virol* 74, 11800-11810.
- Benihoud, K., Yeh, P., and Perricaudet, M. (1999). Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotech* 10, 440-447.
- Benkirane, M., Chun, R. F., Xiao, H., Ogryzko, V. V., Howard, B. H., Nakatani, Y., and Jeang, K. T. (1998). Activation of integrated provirus requires histone acetyltransferase. p300 and P/CAF are coactivators for HIV-1 Tat. *J Biol Chem* 273, 24898-24905.
- Berget, S. M., and Sharp, P. A. (1977). A spliced sequence at the 5'-terminus of adenovirus late mRNA. *Brookhaven Symp Biol*, 332-344.
- Bernards, R., Schrier, P. I., Houweling, A., Bos, J. L., van der Eb, A. J., Zijlstra, M., and Melief, C. J. (1983). Tumorigenicity of cells transformed by adenovirus type 12 by evasion of T-cell immunity. *Nature* 305, 776-779.

- Bernards, R., and Van der Eb, A. J. (1984). Adenovirus: transformation and oncogenicity. *Biochim Biophys Acta* 783, 187-204.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bischoff, J. R., Kirn, D. H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J. A., Sampson Johannes, A., Fattaey, A., and McCormick, F. (1996). An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 274, 373-376.
- Blair Zajdel, M. E., and Blair, G. E. (1988) The intracellular distribution of the transformation-associated protein p53 in adenovirus-transformed rodent cells.
- Blanchette, P., Cheng, C. Y., Yan, Q., Ketner, G., Ornelles, D. A., Dobner, T., Conaway, R. C., Conaway, J. W., and 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.
- Blanco, J. C., Minucci, S., Lu, J., Yang, X. J., Walker, K. K., Chen, H., Evans, R. M., Nakatani, Y., and Ozato, K. (1998). The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev* 12, 1638-1651.
- Blom, N., Gammeltoft, S., and Brunak, S. (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294, 1351-1362.
- Boddy, M. N., Howe, K., Etkin, L. D., Solomon, E., and 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.
- Boger, H. P., Fridell, R. A., Benson, R. E., Hua, J., and Cullen, B. R. (1996). Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay. *Mol Cell Biol* 16, 4207-4214.
- Boisvert, F. M., Kruhlak, M. J., Box, A. K., Hendzel, M. J., and Bazett-Jones, D. P. (2001). The transcription coactivator CBP is a dynamic component of the promyelocytic leukemia nuclear body. *J Cell Biol* 152, 1099-1106.
- Bonifacino, J. S., and Weissman, A. M. (1998). Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 19-57.
- 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., Carlile, G. W., Djavani, M., and Salvato, M. S. (1998a). Two RING finger proteins, the oncoprotein PML and the arenavirus Z protein, colocalize with the nuclear fraction of the ribosomal P proteins. *J Virol* 72, 3819-3826.
- Borden, K. L., Campbell Dwyer, E. J., and Salvato, M. S. (1998b). 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.
- Borrow, J., Stanton, V. P., Jr., Andresen, J. M., Becher, R., Behm, F. G., Chaganti, R. S., Civin, C. I., Distche, C., Dube, I., Frischauf, A. M., *et al.* (1996). The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nat Genet* 14, 33-41.
- Boyer, J. L., and Ketner, G. (2000). Genetic analysis of a potential zinc-binding domain of the adenovirus E4 34k protein. *J Biol Chem* 275, 14969-14978.
- Boyer, J. L., Rohleder, K., and 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.

- Bradley, W. E., and Letovanec, D. (1982). High-frequency nonrandom mutational event at the adenine phosphoribosyltransferase (aprt) locus of sib-selected CHO variants heterozygous for aprt. *Somatic Cell Genet* 8, 51-66.
- Braithwaite, A., Nelson, C., Skulimowski, A., McGovern, J., Pigott, D., and Jenkins, J. (1990). Transactivation of the p53 oncogene by E1a gene products. *Virology* 177, 595-605.
- Bray, M., Prasad, S., Dubay, J. W., Hunter, E., Jeang, K. T., Rekosh, D., and Hammarskjöld, M. L. (1994). A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1256-1260.
- Bridge, E., and Ketner, G. (1989). Redundant control of adenovirus late gene expression by early region 4. *J Virol* 63, 631-638.
- Bridge, E., and Ketner, G. (1990). Interaction of adenoviral E4 and E1b products in late gene expression. *Virology* 174, 345-353.
- Brough, D. E., Hsu, H., Kulesa, V. A., Lee, G. M., Cantolupo, L. J., Lizonova, A., and Kovcsdi, I. (1997). Activation of transgene expression by early region 4 is responsible for a high level of persistent transgene expression from adenovirus vectors in vivo. *J Virol* 71, 9206-9213.
- Brown, J. P. (1997). Mechanism of p53 degradation. *Biochim Biophys Acta* 1332, O1-O6.
- Brownell, J. E., and Allis, C. D. (1996). Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev* 6, 176-184.
- Bruno, S., Ghiotto, F., Fais, F., Fagioli, M., Luzi, L., Pelicci, P. G., Grossi, C. E., and Ciccone, E. (2003). The PML gene is not involved in the regulation of MHC class I expression in human cell lines. *Blood* 101, 3514-3519.
- 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*, pp. 376-379.
- Burgert, H. G., and Blusch, J. H. (2000). Immunomodulatory functions encoded by the E3 transcription unit of adenoviruses. *Virus Genes* 21, 13-25.
- Byrd, P., Brown, K. W., and Gallimore, P. H. (1982). Malignant transformation of human embryo retinoblasts by cloned adenovirus 12 DNA. *Nature* 298, 69-71.
- Campbell Dwyer, E. J., Lai, H., MacDonald, R. C., Salvato, M. S., and Borden, K. L. (2000). The lymphocytic choriomeningitis virus RING protein Z associates with eukaryotic initiation factor 4E and selectively represses translation in a RING-dependent manner. *J Virol* 74, 3293-3300.
- Carlile, G. W., Tatton, W. G., and 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.
- Carvalho, T., Seeler, J. S., Öhman, K., Jordan, P., Pettersson, U., Akusjärvi, G., Carmo Fonseca, M., and Dejean, A. (1995). Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies. *J Cell Biol* 131, 45-56.
- Cathomen, T., and 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.
- Chakravarti, D., Ogryzko, V., Kao, H. Y., Nash, A., Chen, H., Nakatani, Y., and Evans, R. M. (1999). A viral mechanism for inhibition of p300 and PCAF acetyltransferase activity. *Cell* 96, 393-403.
- Chan, H. M., Krstic-Demonacos, M., Smith, L., Demonacos, C., and La Thangue, N. B. (2001). Acetylation control of the retinoblastoma tumour-suppressor protein. *Nat Cell Biol* 3, 667-674.

- Chang, B. D., Broude, E. V., Fang, J., Kalinichenko, T. V., Abdryashitov, R., Poole, J. C., and Roninson, I. B. (2000). p21Waf1/Cip1/Sdi1-induced growth arrest is associated with depletion of mitosis-control proteins and leads to abnormal mitosis and endoreduplication in recovering cells. *Oncogene* *19*, 2165-2170.
- Chang, S. K., Park, B., Shin, J., Ahn, J. H., Kim, I. H., and Ahn, K. (2002). Proto-oncogene PML enhances antigen presentation by MHC class I molecules in human lung cancer cells. *Mol Cells* *14*, 130-135.
- Chartier, C., Degryse, E., Gantzer, M., Dieterle, A., Pavirani, A., and Mehtali, M. (1996). Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J Virol* *70*, 4805-4810.
- Chauvin, C., Suh, M., Remy, C., and Benabid, A. L. (1990). Failure to detect viral genomic sequences of three viruses (herpes simplex, simian virus 40 and adenovirus) in human and rat brain tumors. *Ital J Neurol Sci* *11*, 347-357.
- Chelbi-Alix, M. K., and de The, H. (1999). Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins. *Oncogene* *18*, 935-941.
- Chen, H., Lin, R. J., Schiltz, R. L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M. L., Nakatani, Y., and Evans, R. M. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* *90*, 569-580.
- Chinnadurai, G. (1998). Control of apoptosis by human adenovirus genes. *Semin Virol* *8*, 399-408.
- Chiocca, S., Kurtev, V., Colombo, R., Boggio, R., Scirpi, M. T., Brosch, G., Seiser, C., Draetta, G. F., and Cotten, M. (2002). Histone deacetylase 1 inactivation by an adenovirus early gene product. *Curr Biol* *12*, 594-598.
- Chiou, S. K., and White, E. (1997). p300 binding by E1A cosegregates with p53 induction but is dispensable for apoptosis. *J Virol* *71*, 3515-3525.
- Chow, L. T., Gelinis, R. E., Broker, T. R., and Roberts, R. J. (1977). An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* *12*, 1-8.
- Christ, M., Louis, B., Stoeckel, F., Dieterle, A., Grave, L., Dreyer, D., Kintz, J., Ali Hadji, D., Lusky, M., and Mehtali, M. (2000). Modulation of the inflammatory properties and hepatotoxicity of recombinant adenovirus vectors by the viral E4 gene products. *Hum Gene Ther* *11*, 415-427.
- Cohen, N., Sharma, M., Kentsis, A., Perez, J., Strudwick, S., and Borden, K. L. B. (2001). PML RING suppresses oncogenic transformation by reducing the affinity of eIF4E for mRNA. *EMBO J* *20*, 4547-4559.
- Col, E., Caron, C., Seigneurin-Berny, D., Gracia, J., Favier, A., and Khochbin, S. (2001). The histone acetyltransferase, hGCN5, interacts with and acetylates the HIV transactivator, Tat. *J Biol Chem* *276*, 28179-28184.
- Costanzo, A., Merlo, P., Pediconi, N., Fulco, M., Sartorelli, V., Cole, P. A., Fontemaggi, G., Fanciulli, M., Schiltz, L., Blandino, G., *et al.* (2002). DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes. *Mol Cell* *9*, 175-186.
- D'Amours, D., and Jackson, S. P. (2002). The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 317-327.
- Daniel, M. T., Koken, M., Romagne, O., Barbey, S., Bazarbachi, A., Stadler, M., Guillemain, M. C., Degos, L., Chomienne, C., and de The, H. (1993). PML protein expression in hematopoietic and acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* *82*, 1858-1867.
- Day, P. M., Roden, R. B. S., Lowy, D. R., and Schiller, J. T. (1998). The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Virol* *72*, 142-150.

- de Stanchina, E., McCurrach, M. E., Zindy, F., Shieh, S. Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A. V., Prives, C., Rousset, M. F., Sherr, C. J., and Lowe, S. W. (1998). E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev* 12, 2434-2442.
- de The, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L., and 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., and White, E. (1993). Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev* 7, 546-554.
- Dedieu, J. F., Vigne, E., Torrent, C., Jullien, C., Mahfouz, I., Caillaud, J. M., Aubailly, N., Orsini, C., Guillaume, J. M., Opolon, P., *et al.* (1997). Long-term gene delivery into the livers of immunocompetent mice with E1/E4-defective adenoviruses. *J Virol* 71, 4626-4637.
- Dellaire, G., and Bazett-Jones, D. P. (2004). PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays* 26, 963-977.
- Deng, L., de la Fuente, C., Fu, P., Wang, L., Donnelly, R., Wade, J. D., Lambert, P., Li, H., Lee, C. G., and Kashanchi, F. (2000). Acetylation of HIV-1 Tat by CBP/P300 increases transcription of integrated HIV-1 genome and enhances binding to core histones. *Virology* 277, 278-295.
- Desbois, C., Rousset, R., Bantignies, F., and Jalinot, P. (1996a). Exclusion of int-6 from PML nuclear bodies by binding to the HTLV-I tax oncoprotein. *Science* 273, 951-953.
- Desbois, C., Rousset, R., Bantignies, F., and Jalinot, P. (1996b). Exclusion of Int-6 from PML nuclear bodies by binding to the HTLV-I Tax oncoprotein. *Science* 273, 951-953.
- Desterro, J. M., Rodriguez, M. S., and Hay, R. T. (1998). SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF- κ B activation. *Mol Cell* 2, 233-239.
- Desterro, J. M., Rodriguez, M. S., Kemp, G. D., and Hay, R. T. (1999). Identification of the enzyme required for activation of the small ubiquitin-like protein SUMO-1. *J Biol Chem* 274, 10618-10624.
- Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K., and Zhou, M. M. (1999a). ¹H, ¹⁵N and ¹³C resonance assignments for the bromodomain of the histone acetyltransferase P/CAF. *J Biomol NMR* 14, 291-292.
- Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K., and Zhou, M. M. (1999b). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399, 491-496.
- Dippold, W. G., Jay, G., DeLeo, A. B., Khoury, G., and Old, L. J. (1981). p53 transformation-related protein: detection by monoclonal antibody in mouse and human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 1695-1699.
- Dix, B. R., Edwards, S. J., and Braithwaite, A. W. (2001). Does the antitumor adenovirus ONYX-015/d11520 selectively target cells defective in the p53 pathway? *J Virol* 75, 5443-5447.
- Dix, I., and Leppard, K. N. (1993). Regulated splicing of adenovirus type 5 E4 transcripts and regulated cytoplasmic accumulation of E4 mRNA. *J Virol* 67, 3226-3231.
- Dobner, T., Horikoshi, N., Rubenwolf, S., and Shenk, T. (1996). Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor. *Science* 272, 1470-1473.
- Dobner, T., and Kzhyshkowska, J. (2001). Nuclear export of adenovirus RNA. *Curr Top Microbiol Immunol* 259, 25-54.
- Dormeyer, W., Dorr, A., Ott, M., and Schnolzer, M. (2003). Acetylation of the HIV-1 Tat protein: an in vitro study. *Anal Bioanal Chem* 376, 994-1005.

- Dorr, A., Kiermer, V., Pedal, A., Rackwitz, H. R., Henklein, P., Schubert, U., Zhou, M. M., Verdin, E., and Ott, M. (2002). Transcriptional synergy between Tat and PCAF is dependent on the binding of acetylated Tat to the PCAF bromodomain. *Embo J* 21, 2715-2723.
- Doucas, V., and Evans, R. M. (1996). The PML nuclear compartment and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1288, M25-M29.
- Doucas, V., and 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., and Maul, G. G. (1996). Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure. *Genes Dev* 10, 196-207.
- Doucas, V., Tini, M., Egan, D. A., and Evans, R. M. (1999). Modulation of CREB binding protein function by the promyelocytic (PML) oncoprotein suggests a role for nuclear bodies in hormone signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2627-2632.
- Downey, J. F., Rowe, D. T., Bacchetti, S., Graham, F. L., and Bayley, S. T. (1983). Mapping of a 14,000-dalton antigen to early region 4 of the human adenovirus 5 genome. *J Virol* 45, 514-523.
- Duprez, E., Saurin, A. J., Desterro, J. M., Lallemand-Breitenbach, V., Howe, K., Boddy, M. N., Solomon, E., de The, H., Hay, R. T., and Freemont, P. S. (1999). SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *J Cell Sci* 112 (Pt 3), 381-393.
- Dyck, J. A., Maul, G. G., Miller, W. J., Chen, J. D., Kakizuka, A., and Evans, R. M. (1994). A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell* 78, 799-811.
- Dyson, M. H., Rose, S., and Mahadevan, L. C. (2001). Acetyllysine-binding and function of bromodomain-containing proteins in chromatin. *Front Biosci* 6, D853-865.
- Eckner, R., Arany, Z., Ewen, M., Sellers, W., and Livingston, D. M. (1994). The adenovirus E1A-associated 300-kD protein exhibits properties of a transcriptional coactivator and belongs to an evolutionarily conserved family. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59, 85-95.
- Endter, C., and Dobner, T. (2004). Cell transformation by human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 273, 163-214.
- Endter, C., Hartl, B., Spruss, T., Hauber, J., and Dobner, T. (2005). Blockage of CRM1-dependent nuclear export of the adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa protein augments oncogenic transformation of primary rat cells. *Oncogene* 24, 55-64.
- Endter, C., Kzhyshkowska, J., Stauber, R., and 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., and Bazett-Jones, D. P. (2002). The promyelocytic leukemia nuclear body: sites of activity? *Biochem Cell Biol* 80, 301-310.
- Espinosa, J. M., and Emerson, B. M. (2001). Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol Cell* 8, 57-69.
- Evans, J. D., and 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. (1999). A surprising role for the proteasome in the regulation herpesvirus infection. *TIBS* 24, 293-295.
- Everett, R. D. (2001). DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies. *Oncogene* 20, 7266-7273.

- Everett, R. D., Freemont, P., Saitoh, H., Dasso, M., Orr, A., Kathoria, M., and Parkinson, J. (1998). The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw110- and proteasome-dependent loss of several PML isoforms. *J Virol* 72, 6581-6591.
- Everett, R. D., Meredith, M., and Orr, A. (1999). The ability of herpes simplex virus type 1 immediate-early protein Vmw110 to bind to a ubiquitin-specific protease contributes to its roles in the activation of gene expression and stimulation of virus replication. *J Virol* 73, 417-426.
- Everett, R. D., and Murray, J. (2005). ND10 components relocate to sites associated with herpes simplex virus type 1 nucleoprotein complexes during virus infection. *J Virol* 79, 5078-5089.
- Everett, R. D., Sourvinos, G., and Orr, A. (2003). Recruitment of herpes simplex virus type 1 transcriptional regulatory protein ICP4 into foci juxtaposed to ND10 in live, infected cells. *J Virol* 77, 3680-3689.
- Ewald, D., Li, M., Efrat, S., Auer, G., Wall, R. J., Furth, P. A., and Hennighausen, L. (1996). Time-sensitive reversal of hyperplasia in transgenic mice expressing SV40 T antigen. *Science* 273, 1384-1386.
- 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., *et al.* (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., and 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., and Lowe, S. W. (2000). PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev* 14, 2015-2027.
- Finlan, L., and Hupp, T. R. (2004). The N-terminal interferon-binding domain (IBiD) homology domain of p300 binds to peptides with homology to the p53 transactivation domain. *J Biol Chem* 279, 49395-49405.
- Fischer, U., Meyer, S., Teufel, M., Heckel, C., Luhrmann, R., and Rautmann, G. (1994). Evidence that HIV-1 Rev directly promotes the nuclear export of unspliced RNA. *Embo J* 13, 4105-4112.
- Fling, S. P., and Gregerson, D. S. (1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* 155, 83-88.
- Fogal, V., Gostissa, M., Sandy, P., Zacchi, P., Sternsdorf, T., Jensen, K., Pandolfi, P. P., Will, H., Schneider, C., and Del Sal, G. (2000). Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *EMBO J* 19, 6185-6195.
- Fortunato, E. A., and Spector, D. H. (1998). p53 and RPA are sequestered in viral replication centers in the nuclei of cells infected with human cytomegalovirus. *J Virol* 72, 2033-2039.
- Freyer, G. A., Katoh, Y., and Roberts, R. J. (1984). Characterization of the major mRNAs from adenovirus 2 early region 4 by cDNA cloning and sequencing. *Nucl Acids Res* 12, 3503-3519.
- Fu, M., Rao, M., Wang, C., Sakamaki, T., Wang, J., Di Vizio, D., Zhang, X., Albanese, C., Balk, S., Chang, C., *et al.* (2003). Acetylation of androgen receptor enhances coactivator binding and promotes prostate cancer cell growth. *Mol Cell Biol* 23, 8563-8575.
- Gallimore, P. H., Byrd, P. J., Whittaker, J. L., and Grand, R. J. (1985). Properties of rat cells transformed by DNA plasmids containing adenovirus type 12 E1 DNA or specific fragments of the E1 region: comparison of transforming frequencies. *Cancer Res* 45, 2670-2680.
- Gallimore, P. H., Grand, R. J., and Byrd, P. J. (1986). Transformation of human embryo retinoblasts with simian virus 40, adenovirus and ras oncogenes. *Anticancer Res* 6, 499-508.

- Gao, G. P., Yang, Y., and Wilson, J. M. (1996). Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy. *J Virol* 70, 8934-8943.
- Gey, G. O., Coffman, W. D., and Kubicek, M. T. (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* 12L, 264.
- Giard, R. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., and Parks, W. P. (1973). *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51, 1417-1423.
- Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O. A., Thain, A., Anderson, L. A., Snowden, A. W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N. D., and Hay, R. T. (2003). P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell* 11, 1043-1054.
- Goddard, A. D., Borrow, J., Freemont, P. S., and Solomon, E. (1991). Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. *Science* 254, 1371-1374.
- Gomez-Navarro, J., and Curiel, D. T. (2000). Conditionally replicative adenoviral vectors for cancer gene therapy. *Lancet Oncol* 1, 148-158.
- Gongora, C., David, G., Pintard, L., Tissot, C., Hua, T. D., Dejean, A., and Mechti, N. (1997). Molecular cloning of a new interferon-induced PML nuclear body-associated protein. *J Biol Chem* 272, 19457-19463.
- Gooding, L. R., and Wold, W. S. (1990). Molecular mechanisms by which adenoviruses counteract antiviral immune defenses. *Crit Rev Immunol* 10, 53-71.
- Goodrum, F. D., and Ornelles, D. A. (1998). p53 status does not determine outcome of E1B 55-Kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *J Virol* 72, 9479-9490.
- Goodrum, F. D., Shenk, T., and Ornelles, D. A. (1996). Adenovirus early region 4 34-kilodalton protein directs the nuclear localization of the early region 1B 55-kilodalton protein in primate cells. *J Virol* 70, 6323-6335.
- Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S. E., Scheffner, M., and Del Sal, G. (1999). Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *EMBO J* 18, 6462-6471.
- Gottlieb, T. M., and Oren, M. (1996). p53 in growth control and neoplasia. *Biochim Biophys Acta* 1287, 77-102.
- Graham, F. L. (1984). Transformation by and oncogenicity of human adenoviruses, In *The adenoviruses*, H. S. Ginsberg, ed. (New York: Plenum Press), pp. 339-398.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russel, W. C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-72.
- Graham, F. L., and van der Eb, A. J. (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* 54, 536-539.
- Grand, R. J., Grant, M. L., and Gallimore, P. H. (1994). Enhanced expression of p53 in human cells infected with mutant adenoviruses. *Virology* 203, 229-240.
- Grand, R. J., Turnell, A. S., Mason, G. G., Wang, W., Milner, A. E., Mymryk, J. S., Rookes, S. M., Rivett, A. J., and Gallimore, P. H. (1999). Adenovirus early region 1A protein binds to mammalian SUG1-a regulatory component of the proteasome. *Oncogene* 18, 449-458.
- Grande, M. A., van der Kraan, I., van Steensel, B., Schul, W., de The, H., van der Voort, H. T., de Jong, L., and van Driel, R. (1996). PML-containing nuclear bodies: their spatial distribution in relation to other nuclear components. *J Cell Biochem* 63, 280-291.
- Grave, L., Dreyer, D., Dieterle, A., Leroy, P., Michou, A. I., Doderer, C., Pavirani, A., Lusky, M., and Mehtali, M. (2000). Differential influence of the E4 adenoviral genes on viral and cellular promoters. *J Gene Med* 2, 433-443.

- Greener, A., and Jerpseth, B. (1993). Strategies, In, pp. 57.
- Gregory, D. J., Garcia-Wilson, E., Poole, J. C., Snowden, A. W., Roninson, I. B., and Perkins, N. D. (2002). Induction of transcription through the p300 CRD1 motif by p21WAF1/CIP1 is core promoter specific and cyclin dependent kinase independent. *Cell Cycle* 1, 343-350.
- Grisolano, J. L., Wesselschmidt, R. L., Pelicci, P. G., and Ley, T. J. (1997). Altered myeloid development and acute leukemia in transgenic mice expressing PML-RAR alpha under control of cathepsin G regulatory sequences. *Blood* 89, 376-387.
- Groitel, P., Zeller, T., and Dobner, T. (2005). Construction of adenovirus mutants by direct cloning, In *Adenovirus Methods and Protocols*, W. S. Wold, ed. (Totowa, NJ: Humana Press Inc.).
- Grossman, S. R., Deato, M. E., Brignone, C., Chan, H. M., Kung, A. L., Tagami, H., Nakatani, Y., and Livingston, D. M. (2003). Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science* 300, 342-344.
- Grossman, S. R., Perez, M., Kung, A. L., Joseph, M., Mansur, C., Xiao, Z.-X., Kumar, S., Howley, P. M., and Livingston, D. M. (1998). p300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation. *Mol Cell* 2, 405-415.
- Gu, W., and Roeder, R. G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90, 595-606.
- Gu, W. G., Shi, X.-L., and Roeder, R. G. (1997). Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* 387, 819-823.
- Guo, A., Salomoni, P., Luo, J., Shih, A., Zhong, S., Gu, W., and Paolo Pandolfi, P. (2000). The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 2, 730-736.
- Halbert, D. N., Cutt, J. R., and 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.
- Hamamori, Y., Sartorelli, V., Ogryzko, V., Puri, P. L., Wu, H. Y., Wang, J. Y., Nakatani, Y., and Kedes, L. (1999). Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A. *Cell* 96, 405-413.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Harada, J. N., and Berk, A. J. (1999). p53-independent and -dependent requirements for E1B-55k in adenovirus type 5 replication. *J Virol* 73, 5333-5344.
- Harada, J. N., Shevchenko, A., Pallas, D. C., and Berk, A. J. (2002). Analysis of the adenovirus E1B-55K-anchored proteome reveals its link to ubiquitination machinery. *J Virol* 76, 9194-9206.
- Hasan, S., and Hottiger, M. O. (2002). Histone acetyl transferases: a role in DNA repair and DNA replication. *J Mol Med* 80, 463-474.
- Hassig, C. A., Fleischer, T. C., Billin, A. N., Schreiber, S. L., and Ayer, D. E. (1997). Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A. *Cell* 89, 341-347.
- Haynes, S. R., Dollard, C., Winston, F., Beck, S., Trowsdale, J., and Dawid, I. B. (1992). The bromodomain: a conserved sequence found in human, *Drosophila* and yeast proteins. *Nucleic Acids Res* 20, 2603.
- He, T.-C., Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 2509-2514.
- Heinzel, F. P., Hujer, A. M., Ahmed, F. N., and Rerko, R. M. (1997). In vivo production and function of IL-12 p40 homodimers. *J Immunol* 158, 4381-4388.

- Heise, C., Hermiston, T., Johnson, L., Brooks, G., Sampson-Johannes, A., Williams, A., Hawkins, L., and Kirn, D. (2000). An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat Med* 6, 1134-1139.
- Heise, C. C., Williams, A. M., Xue, S., Probst, M., and Kirn, D. H. (1999). Intravenous administration of ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, induces antitumoral efficacy. *Cancer Res* 59, 2623-2628.
- Henderson, B. R., and Eleftheriou, A. (2000). A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export signals. *Exp Cell Res* 256, 213-224.
- Herrisse, J., Rigolet, M., de Dinechin, S. D., and Galibert, F. (1981). Nucleotide sequence of adenovirus 2 DNA fragment encoding for the carboxylic region of the fiber protein and the entire E4 region. *Nucl Acids Res* 9, 4023-4042.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-479.
- Hilleman, M. R., and Werner, J. H. (1954). Recovery of new agents from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med* 85, 183-188.
- Hodges, M., Tissot, C., and Freemont, P. S. (1998). Protein regulation: tag wrestling with relatives of ubiquitin. *Curr Biol* 8, R749-752.
- Hofmann, T. G., and 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 *Virology*, B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley, eds. (New York: Lippincott-Raven), pp. 2149-2171.
- Horwitz, M. S. (2001). Adenovirus immunoregulatory genes and their cellular targets. *Virology* 279, 1-8.
- Hottiger, M. O., and Nabel, G. J. (1998). Interaction of human immunodeficiency virus type 1 Tat with the transcriptional coactivators p300 and CREB binding protein. *J Virol* 72, 8252-8256.
- Houweling, A., van den Elsen, P. J., and 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., and Hearing, P. (1989). Adenovirus early region 4 encodes two gene products with redundant effects in lytic infection. *J Virol* 63, 2605-2615.
- Hutton, F. G., Turnell, A. S., Gallimore, P. H., and 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.
- Imhof, A., Yang, X. J., Ogryzko, V. V., Nakatani, Y., Wolffe, A. P., and Ge, H. (1997). Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr Biol* 7, 689-692.
- Ishov, A. M., and 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, and Maul, G. G. (1999). PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol* 147, 221-234.
- Ito, A., Lai, C. H., Zhao, X., Saito, S., Hamilton, M. H., Appella, E., and Yao, T. P. (2001). p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *Embo J* 20, 1331-1340.
- Javier, R. T., Raska, K., Jr., Macdonald, G. J., and Shenk, T. (1991). Human adenovirus type 9-induced rat mammary tumors. *J Virol* 65, 3192-3202.

- Jeanmougin, F., Wurtz, J. M., Le Douarin, B., Chambon, P., and Losson, R. (1997). The bromodomain revisited. *Trends Biochem Sci* 22, 151-153.
- Jensen, K., Shiels, C., and Freemont, P. S. (2001). PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* 20, 7223-7233.
- Johnson, P. R., Swanson, R., Rakhilina, L., and Hochstrasser, M. (1998). Degradation signal masking by heterodimerization of MATalpha2 and MATa1 blocks their mutual destruction by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* 94, 217-227.
- Jones, N., and Shenk, T. (1979). Isolation of adenovirus type 5 host range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cells. *Cell* 17, 683-689.
- Jonsson, N., and 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., and 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.
- Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S. C., Heyman, R. A., Rose, D. W., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85, 403-414.
- Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H. P., Wada, H., Fukuda-Kamitani, T., and Yeh, E. T. (1998a). Identification of three major sentrinization sites in PML. *J Biol Chem* 273, 26675-26682.
- Kamitani, T., Nguyen, H. P., Kito, K., Fukuda-Kamitani, T., and Yeh, E. T. (1998b). Covalent modification of PML by the sentrin family of ubiquitin-like proteins. *J Biol Chem* 273, 3117-3120.
- Kastner, P., Perez, A., Lutz, Y., Rochette Egly, C., Gaub, M. P., Durand, B., Lanotte, M., Berger, R., and 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.
- Kawasaki, H., Eckner, R., Yao, T. P., Taira, K., Chiu, R., Livingston, D. M., and Yokoyama, K. K. (1998). Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation. *Nature* 393, 284-289.
- Kee, B. L., Arias, J., and Montminy, M. R. (1996). Adaptor-mediated recruitment of RNA polymerase II to a signal-dependent activator. *J Biol Chem* 271, 2373-2375.
- Kentsis, A., Dwyer, E. C., Perez, J. M., Sharma, M., Chen, A., Pan, Z. Q., and Borden, K. L. (2001). The RING domains of the promyelocytic leukemia protein PML and the arenaviral protein Z repress translation by directly inhibiting translation initiation factor eIF4E. *J Mol Biol* 312, 609-623.
- Khan, M. M., Nomura, T., Kim, H., Kaul, S. C., Wadhwa, R., Shinagawa, T., Ichikawa-Iwata, E., Zhong, S., Pandolfi, P. P., and Ishii, S. (2001). Role of PML and PML-RARalpha in Mad-mediated transcriptional repression. *Mol Cell* 7, 1233-1243.
- Khuri, F. R., Nemunaitis, J., Ganly, I., Arseneau, J., Tannock, I. F., Romel, L., Gore, M., Ironside, J., MacDougall, R. H., Heise, C., *et al.* (2000). A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med* 6, 879-885.
- Kiernan, R. E., Vanhulle, C., Schiltz, L., Adam, E., Xiao, H., Maudoux, F., Calomme, C., Burny, A., Nakatani, Y., Jeang, K. T., *et al.* (1999). HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation. *Embo J* 18, 6106-6118.

- Kirn, D. (2001). Oncolytic virotherapy for cancer with the adenovirus dl1520 (Onyx-015): results of phase I and II trials. *Expert Opin Biol Ther* 1, 525-538.
- Knoepfler, P. S., and Eisenman, R. N. (1999). Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell* 99, 447-450.
- Ko, L. J., and Prives, C. (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 10, 1054-1072.
- Kobet, E., Zeng, X., Zhu, Y., Keller, D., and Lu, H. (2000). MDM2 inhibits p300-mediated p53 acetylation and activation by forming a ternary complex with the two proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12547-12552.
- Kochanek, S., Clemens, P. R., Mitani, K., Chen, H. H., Chan, S., and Caskey, C. T. (1996). A new adenoviral vector: replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. *PNAS* 93, 5731-5736.
- Koken, M. H., Puvion-Dutilleul, F., Guillemin, M. C., Viron, A., Linares-Cruz, G., Stuurman, N., de Jong, L., Szosteck, C., Calvo, F., Chomienne, C., and et al. (1994). The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion. *Embo J* 13, 1073-1083.
- König, C., Roth, J., and Dobbelstein, M. (1999). Adenovirus type 5 E4orf3 protein relieves p53 inhibition by E1B-55-kilodalton protein. *J Virol* 73, 2253-2262.
- Kouzarides, T. (2000). Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *Embo J* 19, 1176-1179.
- Kuhlmann, I., Achten, S., Rudolph, R., and 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.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laherty, C. D., Yang, W. M., Sun, J. M., Davie, J. R., Seto, E., and Eisenman, R. N. (1997). Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* 89, 349-356.
- Lai, H.-K., and 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.
- Lai, Z., Ferry, K. V., Diamond, M. A., Wee, K. E., Kim, Y. B., Ma, J., Yang, T., Benfield, P. A., Copeland, R. A., and Auger, K. R. (2001). Human mdm2 mediates multiple mono-ubiquitination of p53 by a mechanism requiring enzyme isomerization. *J Biol Chem* 276, 31357-31367.
- LaMorte, V. J., Dyck, J. A., Ochs, R. L., and Evans, R. M. (1998). Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4991-4996.
- Lang, S. E., and Hearing, P. (2003). The adenovirus E1A oncoprotein recruits the cellular TRRAP/GCN5 histone acetyltransferase complex. *Oncogene* 22, 2836-2841.
- Lassam, N. J., Bayley, S. T., and Graham, F. L. (1979). Tumor antigens of human Ad5 in transformed cells and in cells infected with transformation-defective host-range mutants. *Cell* 18, 781-791.
- Lee, H. Y., Dohi, D. F., Kim, Y. H., Walsh, G. L., Consoli, U., Andreeff, M., Dawson, M. I., Hong, W. K., and Kurie, J. M. (1998). All-trans retinoic acid converts E2F into a transcriptional suppressor and inhibits the growth of normal human bronchial epithelial cells through a retinoic acid receptor- dependent signaling pathway. *J Clin Invest* 101, 1012-1019.
- Leppard, K. N., and Everett, R. D. (1999). The adenovirus type 5 E1b 55K and E4 Orf3 proteins associate in infected cells and affect ND10 components. *J Gen Virol* 80, 997-1008.
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.

- Li, M., Luo, J., Brooks, C. L., and Gu, W. (2002). Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J Biol Chem* 277, 50607-50611.
- Lill, N. L., Grossman, S. R., Ginsberg, D., DeCaprio, J., and Livingston, D. M. (1997). Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* 387, 823-827.
- Liu, L., Scolnick, D. M., Trievel, R. C., Zhang, H. B., Marmorstein, R., Halazonetis, T. D., and Berger, S. L. (1999). p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 19, 1202-1209.
- Logan, J., and Shenk, T. (1984). Adenovirus tripartite leader sequence enhances translation of mRNAs late after infection. *PNAS* 81, 3655-3659.
- Lowe, S. W., and Ruley, H. E. (1993). Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev* 7, 535-545.
- Lundblad, J. R., Kwok, R. P., Lurance, M. E., Harter, M. L., and Goodman, R. H. (1995). Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP. *Nature* 374, 85-88.
- Lusky, M., Christ, M., Rittner, K., Dieterle, A., Dreyer, D., Mourot, B., Schultz, H., Stoeckel, F., Pavirani, A., and Mehtali, M. (1998). In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J Virol* 72, 2022-2032.
- Mackey, J. K., Green, M., Wold, W. S. M., and Ridgen, 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., and Green, M. (1976). Do highly oncogenic group A human adenoviruses cause human cancer? Analysis of human tumors for adenovirus 12 transforming DNA sequences. *PNAS* 73, 4657-4661.
- Mahajan, R., Gerace, L., and Melchior, F. (1998). Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association. *J Cell Biol* 140, 259-270.
- Marcellus, R. C., Teodoro, J. G., Wu, T., Brough, D. E., Ketner, G., Shore, G. C., and Branton, P. E. (1996). Adenovirus type 5 early region 4 is responsible for E1A-induced p53-independent apoptosis. *J Virol* 70, 6207-6215.
- Martinez-Balbas, M. A., Bauer, U. M., Nielsen, S. J., Brehm, A., and Kouzarides, T. (2000). Regulation of E2F1 activity by acetylation. *Embo J* 19, 662-671.
- Marzio, G., Tyagi, M., Gutierrez, M. I., and Giacca, M. (1998). HIV-1 tat transactivator recruits p300 and CREB-binding protein histone acetyltransferases to the viral promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13519-13524.
- Marzio, G., Wagener, C., Gutierrez, M. I., Cartwright, P., Helin, K., and Giacca, M. (2000). E2F family members are differentially regulated by reversible acetylation. *J Biol Chem* 275, 10887-10892.
- Mathews, M. B., and Shenk, T. (1991). Adenovirus virus-associated RNA and translation control. *J Virol* 65, 5657-5662.
- Matunis, M. J., Coutavas, E., and Blobel, G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 135, 1457-1470.
- Matunis, M. J., Wu, J., and Blobel, G. (1998). SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 140, 499-509.
- Maul, G. G., and Everett, R. D. (1994). The nuclear location of PML, a cellular member of the C3HC4 zinc-binding domain protein family, is rearranged during herpes simplex virus infection by the C3HC4 viral protein ICP0. *J Gen Virol* 75 (Pt 6), 1223-1233.

- Maul, G. G., Negorev, D., Bell, P., and Ishov, A. M. (2000). Review: Properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs. *J Struct Biol* 129, 278-287.
- McKenna, N. J., Lanz, R. B., and O'Malley, B. W. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20, 321-344.
- McLorie, W., McGlade, C. J., Takayasu, D., and Branton, P. E. (1991). Individual adenovirus E1B proteins induce transformation independently but by additive pathways. *J Gen Virol* 72, 1467-1471.
- Meek, D. W. (1999). Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene* 18, 7666-7675.
- Meier, J. L. (2001). Reactivation of the human cytomegalovirus major immediate-early regulatory region and viral replication in embryonal NTERA2 cells: role of trichostatin A, retinoic acid, and deletion of the 21-base-pair repeats and modulator. *J Virol* 75, 1581-1593.
- Melchior, F. (2000). SUMO - nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Biol* 16, 591-626.
- Melnick, A., and 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.
- Merezak, C., Reichert, M., Van Lint, C., Kerkhofs, P., Portetelle, D., Willems, L., and Kettmann, R. (2002). Inhibition of histone deacetylases induces bovine leukemia virus expression in vitro and in vivo. *J Virol* 76, 5034-5042.
- Merika, M., Williams, A. J., Chen, G., Collins, T., and Thanos, D. (1998). Recruitment of CBP/p300 by the IFN beta enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. *Mol Cell* 1, 277-287.
- Meyer, B. E., and Malim, M. H. (1994). The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev* 8, 1538-1547.
- 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., and 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., and Falke, D. (1997). *Molekulare Virologie* (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH).
- Moore, M., Horikoshi, N., and Shenk, T. (1996). Oncogenic potential of the adenovirus E4orf6 protein. *PNAS* 93, 11295-11301.
- Moran, E. (1993). Interaction of adenoviral proteins with pRB and p53. *Faseb J* 7, 880-885.
- Morris-Desbois, C., Bochar, V., Reynaud, C., and Jalinot, P. (1999). Interaction between the Ret finger protein and the Int-6 gene product and co-localisation into nuclear bodies. *J Cell Sci* 112 (Pt 19), 3331-3342.
- Mujtaba, S., He, Y., Zeng, L., Farooq, A., Carlson, J. E., Ott, M., Verdin, E., and Zhou, M. M. (2002). Structural basis of lysine-acetylated HIV-1 Tat recognition by PCAF bromodomain. *Mol Cell* 9, 575-586.
- Muller, S., and Dejean, A. (1999). Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption. *J Virol* 73, 5137-5143.
- Muller, S., Matunis, M. J., and Dejean, A. (1998). Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J* 17, 61-70.
- Müller, S., Matunis, M. J., and Dejean, A. (1998). Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J* 17, 61-70.
- Munshi, N., Merika, M., Yie, J., Senger, K., Chen, G., and Thanos, D. (1998). Acetylation of HMG I(Y) by CBP turns off IFN beta expression by disrupting the enhanceosome. *Mol Cell* 2, 457-467.

- Murakami, S. (2001). Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator. *J Gastroenterol* 36, 651-660.
- Muraoka, M., Konishi, M., Kikuchi-Yanoshita, R., Tanaka, K., Shitara, N., Chong, J. M., Iwama, T., and Miyaki, M. (1996). p300 gene alterations in colorectal and gastric carcinomas. *Oncogene* 12, 1565-1569.
- Murphy, M., Ahn, J., Walker, K. K., Hoffman, W. H., Evans, R. M., Levine, A. J., and George, D. L. (1999). Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev* 13, 2490-2501.
- Nagy, L., Kao, H. Y., Chakravarti, D., Lin, R. J., Hassig, C. A., Ayer, D. E., Schreiber, S. L., and Evans, R. M. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* 89, 373-380.
- Nakajima, T., Uchida, C., Anderson, S. F., Lee, C. G., Hurwitz, J., Parvin, J. D., and Montminy, M. (1997). RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell* 90, 1107-1112.
- Nakamura, S., Roth, J. A., and 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., and Maul, G. G. (2001). Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot. *Oncogene* 20, 7234-7242.
- Nemunaitis, J., Ganly, I., Khuri, F., Arseneau, J., Kuhn, J., McCarty, T., Landers, S., Maples, P., Romel, L., Randlev, B., *et al.* (2000). Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial. *Cancer Res* 60, 6359-6366.
- Nevels, M. (1999) Oncogenes Potential des E4orf6- und E4orf3-Proteins von Adenovirus Typ 5, Dissertation, Universität Regensburg.
- Nevels, M., Paulus, C., and Shenk, T. (2004a). Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein facilitates viral replication by antagonizing histone deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17234-11729.
- Nevels, M., Paulus, C., and Shenk, T. (2004b). Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein facilitates viral replication by antagonizing histone deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17234-17239.
- Nevels, M., Rubenwolf, S., Spruss, T., Wolf, H., and Dobner, T. (1997a). The adenovirus E4orf6 protein can promote E1A/E1B-induced focus formation by interfering with p53 tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 1206-1211.
- Nevels, M., Rubenwolf, S., Spruss, T., Wolf, H., and Dobner, T. (1997b). The adenovirus type 5 E4orf6 protein cooperates with E1A and E1B proteins in the oncogenic transformation of primary rodent cells. *J Cancer Res and Clin Oncol* 123.
- Nevels, M., Spruss, T., Wolf, H., and 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., and Dobner, T. (1999b). Transforming potential of the adenovirus type 5 E4orf3 protein. *J Virol* 73, 1591-1600.
- Nevels, M., Täuber, B., Spruss, T., Wolf, H., and Dobner, T. (2001). "Hit-and-run" transformation by adenovirus oncogenes. *J Virol* 75, 3089-3094.
- Nicolas, A. L., Munz, P. L., Falck-Pedersen, E., and 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.

- Nozawa, N., Yamauchi, Y., Ohtsuka, K., Kawaguchi, Y., and Nishiyama, Y. (2004). Formation of aggresome-like structures in herpes simplex virus type 2-infected cells and a potential role in virus assembly. *Exp Cell Res* 299, 486-497.
- O'Neal, W. K., Zhou, H., Morral, N., Aguilar Cordova, E., Pestaner, J., Langston, C., Mull, B., Wang, Y., Beaudet, A. L., and Lee, B. (1998). Toxicological comparison of E2a-deleted and first-generation adenoviral vectors expressing alpha1-antitrypsin after systemic delivery. *Hum Gene Ther* 9, 1587-1598.
- O'Shea, C. C., Johnson, L., Bagus, B., Choi, S., Nicholas, C., Shen, A., Boyle, L., Pandey, K., Soria, C., Kunich, J., *et al.* (2004). Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity. *Cancer Cell* 6, 611-623.
- Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H., and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-959.
- Ornelles, D. A., and Shenk, T. (1991). Localization of the adenovirus early region 1B 55-kilodalton protein during lytic infection: association with nuclear viral inclusions requires the early region 4 34-kilodalton protein. *J Virol* 65, 424-429.
- Ott, M., Schnolzer, M., Garnica, J., Fischle, W., Emiliani, S., Rackwitz, H. R., and Verdin, E. (1999). Acetylation of the HIV-1 Tat protein by p300 is important for its transcriptional activity. *Curr Biol* 9, 1489-1492.
- Paraskeva, C., Brown, K. W., Dunn, A. R., and 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., and Gallimore, P. H. (1980). Tumorigenicity and in vitro characteristics of rat liver epithelial cells and their adenovirus-transformed derivatives. *Int J Cancer* 25, 631-639.
- Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P. P., and Pelicci, P. G. (2000). PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* 406, 207-210.
- Perkins, N. D. (2002). Not just a CDK inhibitor: regulation of transcription by p21(WAF1/CIP1/SDI1). *Cell Cycle* 1, 39-41.
- Perkins, N. D., Felzien, L. K., Betts, J. C., Leung, K., Beach, D. H., and Nabel, G. J. (1997). Regulation of NF-kappaB by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator. *Science* 275, 523-527.
- Petrij, F., Giles, R. H., Dauwerse, H. G., Saris, J. J., Hennekam, R. C., Masuno, M., Tommerup, N., van Ommen, G. J., Goodman, R. H., Peters, D. J., and *et al.* (1995). Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature* 376, 348-351.
- Pfeffer, A., Schubert, R., Orend, G., Hilger-Eversheim, K., and Doerfler, W. (1999). Integrated viral genomes can be lost from adenovirus type 12-induced hamster tumor cells in a clone-specific, multistep process with retention of the oncogenic phenotype. *Virus Res* 59, 113-127.
- Pickart, C. M. (1997). Targeting of substrates to the 26S proteasome. *Faseb J* 11, 1055-1066.
- Pollard, V. W., and Malim, M. H. (1998). The HIV-1 rev protein. *Annu Rev Microbiol* 52, 491-532.
- Punga, T., and Akusjärvi, G. (2000). The adenovirus-2 E1B-55K protein interacts with a mSin3A/histone deacetylase 1 complex. *FEBS Lett* 476, 248-252.
- Puntervoll, P., Linding, R., Gemund, C., Chabanis-Davidson, S., Mattingsdal, M., Cameron, S., Martin, D. M., Ausiello, G., Brannetti, B., Costantini, A., *et al.* (2003). ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. *Nucleic Acids Res* 31, 3625-3630.

- Puri, P. L., Sartorelli, V., Yang, X. J., Hamamori, Y., Ogryzko, V. V., Howard, B. H., Kedes, L., Wang, J. Y., Graessmann, A., Nakatani, Y., and Levrero, M. (1997). Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol Cell* *1*, 35-45.
- Puvion-Dutilleul, F., Chelbi-Alix, M. K., Koken, M., Quignon, F., Puvion, E., and de The, H. (1995). Adenovirus infection induces rearrangements in the intranuclear distribution of the nuclear body-associated PML protein. *Exp Cell Res* *218*, 9-16.
- Qin, X. Q., Livingston, D. M., Kaelin, W. G., Jr., and Adams, P. D. (1994). Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 10918-10922.
- Querido, E., Blanchette, P., Yan, Q., Kamura, T., Morrison, M., Boivin, D., Kaelin, W. G., Conaway, R. C., Conaway, J. W., and Branton, P. E. (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., and Branton, P. E. (1997a). 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., and 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.
- Querido, E., Teodoro, J. G., and Branton, P. E. (1997b). Accumulation of p53 induced by the adenovirus E1A protein requires regions involved in the stimulation of DNA synthesis. *J Virol* *71*, 3526-3533.
- Rafii, S., Dias, S., Meeus, S., Hattori, K., Ramachandran, R., Feuerback, F., Worgall, S., Hackett, N. R., and Crystal, R. G. (2001). Infection of endothelium with E1(-)E4(+), but not E1(-)E4(-), adenovirus gene transfer vectors enhances leukocyte adhesion and migration by modulation of ICAM-1, VCAM-1, CD34, and chemokine expression. *Circ Res* *88*, 903-910.
- Rechsteiner, M. (1987). Ubiquitin-mediated pathways for intracellular proteolysis. *Annu Rev Cell Biol* *3*, 1-30.
- Regad, T., and Chelbi-Alix, M. K. (2001). Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene* *20*, 7274-7286.
- Regad, T., Saib, A., Lallemand-Breitenbach, V., Pandolfi, P. P., de The, H., and Chelbi-Alix, M. K. (2001). PML mediates the interferon-induced antiviral state against a complex retrovirus via its association with the viral transactivator. *Embo J* *20*, 3495-3505.
- Reich, N. C., Sarnow, P., Duprey, E., and Levine, A. J. (1983). Monoclonal antibodies which recognize native and denatured forms of the adenovirus DNA-binding protein. *Virology* *128*, 480-484.
- Reid, J. L., Bannister, A. J., Zegerman, P., Martinez-Balbas, M. A., and Kouzarides, T. (1998). E1A directly binds and regulates the P/CAF acetyltransferase. *Embo J* *17*, 4469-4477.
- Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzi, L., Riganelli, D., Zanaria, E., Messali, S., Cainarca, S., *et al.* (2001). The tripartite motif family identifies cell compartments. *Embo J* *20*, 2140-2151.
- Ricciardi, R. P. (1995). Transformation and tumorigenesis mediated by the adenovirus E1A and E1B oncogenes, In *DNA Tumor Viruses: Oncogenic Mechanisms*, G. Barbanti-Brodano, ed. (New York: Plenum Press), pp. 195-210.
- Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Lane, D. P., and Hay, R. T. (2000). Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* *20*, 8458-8467.
- Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Midgley, C. A., Lane, D. P., and Hay, R. T. (1999). SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO J* *18*, 6455-6461.

- Ross, D., and Ziff, E. (1992). Defective synthesis of early region 4 mRNAs during abortive adenovirus infections in monkey cells. *J Virol* 66, 3110-3117.
- Roth, J., Dobbstein, M., Freedman, D. A., Shenk, T., and Levine, A. J. (1998a). Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via pathways used by the human immunodeficiency virus rev protein. *EMBO J* 17, 554-564.
- Roth, J., König, C., Wienzek, S., Weigel, S., Ristea, S., and Dobbstein, M. (1998b). Inactivation of p53 but not p73 by adenovirus type 5 E1B 55-Kilodalton and E4 34-Kilodalton oncoproteins. *J Virol* 72, 8510-8516.
- Rothmann, T., Hengstermann, A., Whitaker, N. J., Scheffner, M., and zur Hausen, H. (1998). Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J Virol* 72, 9470-9478.
- Rotter, V., Abutbul, H., and Ben-Ze'ev, A. (1983). P53 transformation-related protein accumulates in the nucleus of transformed fibroblasts in association with the chromatin and is found in the cytoplasm of non-transformed fibroblasts. *Embo J* 2, 1041-1047.
- Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrot, R. H., and 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., and 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., and Pandolfi, P. P. (2000). The puzzling multiple lives of PML and its role in the genesis of cancer. *Bioessays* 22, 827-835.
- Russel, W. C. (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* 81, 2573-2604.
- Saavedra, C. A., Hammell, C. M., Heath, C. V., and Cole, C. N. (1997). Yeast heat shock mRNAs are exported through a distinct pathway defined by Rip1p. *Genes Dev* 11, 2845-2856.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Saitoh, H., Pu, R. T., and Dasso, M. (1997). SUMO-1: wrestling with a new ubiquitin-related modifier. *Trends Biochem Sci* 22, 374-376.
- Sakaguchi, K., Herrera, J. E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C. W., and Appella, E. (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* 12, 2831-2841.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Samuelson, A. V., Narita, M., Chan, H. M., Jin, J., de Stanchina, E., McCurrach, M. E., Fuchs, M., Livingston, D. M., and Lowe, S. W. (2005). p400 is required for E1A to promote apoptosis. *J Biol Chem* 280, 21915-21923.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Sarnow, P., Hearing, P., Anderson, C. W., Halbert, D. N., Shenk, T., and 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., Hearing, P., Anderson, C. W., Reich, N., and Levine, A. J. (1982a). Identification and characterization of an immunologically conserved adenovirus early region 11,000 Mr protein and its association with the nuclear matrix. *J Mol Biol* 162, 565-583.

- Sarnow, P., Ho, Y. S., Williams, J., and Levine, A. J. (1982b). 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., and Freemont, P. S. (1996). Does this have a familiar RING? *Trends Biochem Sci* 21, 208-214.
- Schiedner, G., Hertel, S., and 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.
- Schiltz, R. L., Mizzen, C. A., Vassilev, A., Cook, R. G., Allis, C. D., and Nakatani, Y. (1999). Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. *J Biol Chem* 274, 1189-1192.
- Schlesinger, D. H., Goldstein, G., and Niall, H. D. (1975). The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochemistry* 14, 2214-2218.
- Scolnick, D. M., Chehab, N. H., Stavridi, E. S., Lien, M. C., Caruso, L., Moran, E., Berger, S. L., and Halazonetis, T. D. (1997). CREB-binding protein and p300/CBP-associated factor are transcriptional coactivators of the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res* 57, 3693-3696.
- Seeler, J. S., and Dejean, A. (2003). Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 690-699.
- Sharma, R. C., and Schimke, R. T. (1996). Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium, In *Biotechniques*, pp. 42-44.
- Shen, Y., Zhu, H., and Shenk, T. (1997). Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate "hit-and-run" oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 3341-3345.
- Shenk, T. (1996). Adenoviridae: the viruses and their replication, In *Virology*, B. N. Field, D. M. Knipe, and P. M. Howley, eds. (New York: Lippincott-Raven), pp. 2111-2148.
- Shenk, T. (2001). Adenoviridae: the viruses and their replication, In *Virology*, D. M. Knipe, and P. M. Howley, eds. (New York: Lippincott-Raven), pp. 2265-2300.
- Shestakova, E., Bandu, M. T., Doly, J., and Bonnefoy, E. (2001). Inhibition of histone deacetylation induces constitutive derepression of the beta interferon promoter and confers antiviral activity. *J Virol* 75, 3444-3452.
- Shuen, M., Avvakumov, N., Torchia, J., and Mymryk, J. S. (2003). The E1A proteins of all six human adenovirus subgroups target the p300/CBP acetyltransferases and the SAGA transcriptional regulatory complex. *Virology* 316, 75-83.
- Smith, G. C., and Jackson, S. P. (1999). The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* 13, 916-934.
- Snowden, A. W., Anderson, L. A., Webster, G. A., and Perkins, N. D. (2000). A novel transcriptional repression domain mediates p21(WAF1/CIP1) induction of p300 transactivation. *Mol Cell Biol* 20, 2676-2686.
- Somasundaram, K., and El-Deiry, W. S. (1997). Inhibition of p53-mediated transactivation and cell cycle arrest by E1A through its p300/CBP-interacting region. *Oncogene* 14, 1047-1057.
- Stadler, M., Chelbi-Alix, M. K., Koken, M. H., Venturini, L., Lee, C., Saib, A., Quignon, F., Pelicano, L., Guillemin, M. C., Schindler, C., and 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.
- Steegenga, W., Riceto, N., and Bos, J. L. (1999). Infectivity and expression of the early adenovirus proteins are important regulators of wild-type and Δ E1B adenovirus replication in human cells. *Oncogene* 18, 5032-5043.

- Steegenga, W. T., Riteco, N., Jochemsen, A. G., Fallaux, F. J., and Bos, J. L. (1998). The large E1B protein together with the E4orf6 protein target p53 for active degradation in adenovirus infected cells. *Oncogene 16*, 349-357.
- Sterner, D. E., and Berger, S. L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev 64*, 435-459.
- Sternsdorf, T., Grotzinger, T., Jensen, K., and Will, H. (1997). Nuclear dots: actors on many stages. *Immunobiology 198*, 307-331.
- Stout, J. T., and Caskey, C. T. (1985). HPRT: gene structure, expression, and mutation. *Annu Rev Genet 19*, 127-148.
- Stracker, T. H., Carson, C. T., and Weitzman, M. D. (2002). Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11 Rad50 NBS1 DNA repair complex. *Nature 418*, 348-352.
- Strudwick, S., and Borden, K. L. (2002). Finding a role for PML in APL pathogenesis: a critical assessment of potential PML activities. *Leukemia 16*, 1906-1917.
- Struhl, K. (1998). Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev 12*, 599-606.
- Subramanian, T., La Regina, M., and Chinnadurai, G. (1989). Enhanced ras oncogene mediated cell transformation and tumorigenesis by adenovirus 2 mutants lacking the C-terminal region of E1a protein. *Oncogene 4*, 415-420.
- Szekely, L., Pokrovskaja, K., Jiang, W. G., de Thè, H., Ringertz, N., and Klein, G. (1996). The Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA5 accumulates in PML-containing bodies. *J Virol 70*, 2562-2568.
- Täuber, B. (2002) Analysen zum transformierenden Potenzial des E4orf3-Proteins von Adenovirus Serotyp 5, Universität Regensburg, Regensburg.
- Täuber, B., and Dobner, T. (2001a). Adenovirus early E4 genes in viral oncogenesis. *Oncogene 20*, 7847-7854.
- Täuber, B., and Dobner, T. (2001b). Efficient transformation of primary rabbit epithelial cells by adenovirus type 5 E1 and E4 oncoproteins, Paper presented at: ICRF/UCSF 2001 DNA Tumour Virus Meeting (Cambridge, England).
- Täuber, B., and Dobner, T. (2001c). Molecular regulation and biological function of adenovirus early genes: the E4 ORFs. *Gene 278*, 1-23.
- Teodoro, J. G., Shore, G. C., and Branton, P. E. (1995). Adenovirus E1A proteins induce apoptosis by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene 11*, 467-474.
- Thomas, A., and White, E. (1998). Suppression of the p300-dependent mdm2 negative-feedback loop induces the p53 apoptotic function. *Genes Dev 12*, 1975-1985.
- Thomas, D. L., Schaack, J., Vogel, H., and Javier, R. T. (2001). Several E4 region functions influence mammary tumorigenesis by human adenovirus type 9. *J Virol 75*, 557-568.
- Tigges, M. A., and Raskas, H. J. (1984). Splice junctions in adenovirus 2 early region 4 mRNAs: multiple splice sites produce 18 to 24 RNAs. *J Virol 50*, 106-117.
- Tooze, J. (1981). DNA tumor viruses, In Cold Spring Harbor (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 943-1054.
- Topcu, Z., Mack, D. L., Hromas, R. A., and Borden, K. L. (1999). The promyelocytic leukemia protein PML interacts with the proline-rich homeodomain protein PRH: a RING may link hematopoiesis and growth control. *Oncogene 18*, 7091-7100.

- Trentin, J. J., Yabe, Y., and 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.
- Trouche, D., Cook, A., and Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator stimulates E2F1/DPI activity. *Nucleic Acids Res* 24, 4139-4145.
- Turnell, A. S., Grand, R. J., Gorbea, C., Zhang, X., Wang, W., Mymryk, J. S., and Gallimore, P. H. (2000). Regulation of the 26S proteasome by adenovirus E1A. *EMBO J* 19, 4759-4773.
- Turnell, A. S., Grand, R. J. A., and Gallimore, P. H. (1999). The replicative capacities of large E1B-null group A and group C adenoviruses are independent of host cell p53 status. *J Virol* 73, 2074-2083.
- van den Heuvel, S. J. L., The, S. I., Klein, B., Jochemsen, A. G., Zantema, A., and 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., and 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., and 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.
- Virtanen, A., Gilardi, P., Naslund, A., LeMoullec, J. M., Pettersson, U., and Perricaudet, M. (1984). mRNAs from human adenovirus 2 early region 4. *J Virol* 51, 822-831.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.
- Wang, H. G., Rikitake, Y., Carter, M. C., Yaciuk, P., Abraham, S. E., Zerler, B., and Moran, E. (1993). Identification of specific adenovirus E1A N-terminal residues critical to the binding of cellular proteins and to the control of cell growth. *J Virol* 67, 476-488.
- Wang, Q., Greenburg, G., Bunch, D., Farson, D., and Finer, M. H. (1997). Persistent transgene expression in mouse liver following in vivo gene transfer with a delta E1/delta E4 adenovirus vector. *Gene Ther* 4, 393-400.
- Wang, X. W., Tseng, A., Ellis, N. A., Spillare, E. A., Linke, S. P., Robles, A. I., Seker, H., Yang, Q., Hu, P., Beresten, S., *et al.* (2001). Functional interaction of p53 and BLM DNA helicase in apoptosis. *J Biol Chem* 276, 32948-32955.
- Weiden, M. D., and Ginsberg, H. S. (1994). Deletion of the E4 region of the genome produces adenovirus DNA concatemers. *PNAS* 91, 153-157.
- Weis, K., Rambaud, S., Lavau, C., Jansen, J., Carvalho, T., Carmo-Fonseca, M., Lamond, A., and Dejean, A. (1994). Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells. *Cell* 76, 345-356.
- Welchman, R. L., Gordon, C., and Mayer, R. J. (2005). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 599-609.
- 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., and Gallimore, P. H. (1984). Isolation and characterization of four adenovirus type 12-transformed human embryo kidney cell lines. *Mol Cell Biol* 4, 110-116.

- Whyte, P., Williamson, N. M., and Harlow, E. (1989). Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell* 56, 67-75.
- Wienzek, S., and Dobbstein, M. (2001). Viral and cellular factors that target the promyelocytic leukemia oncogenic domains strongly activate a glucocorticoid-responsive promoter. *J Virol* 75, 5391-5397.
- Wienzek, S., Roth, J., and Dobbstein, 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.
- Wilkinson, G. W. G., Kelly, C., Sinclair, J. H., and Rickards, C. (1998). Disruption of PML-associated nuclear bodies mediated by the human cytomegalovirus major immediate early gene product. *J Gen Virol* 79, 1233-1245.
- Williams, J., Williams, M., Liu, C., and Telling, G. (1995). Assessing the role of E1A in the differential oncogenicity of group A and group C human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 199, 149-175.
- Wold, W. S., Mackey, J. K., Brackmann, K. H., Takemori, N., Rigden, P., and Green, M. (1978). Analysis of human tumors and human malignant cell lines for BK virus-specific DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 454-458.
- Wolffe, A. P., and Pruss, D. (1996). Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell* 84, 817-819.
- Wsierska-Gadek, J., and Horvath, M. (2003). How the nucleolar sequestration of p53 protein or its interplayers contributes to its (re)-activation. *Ann N Y Acad Sci* 1010, 266-272.
- Xie, A. Y., Bermudez, V. P., and Folk, W. R. (2002). Stimulation of DNA replication from the polyomavirus origin by PCAF and GCN5 acetyltransferases: acetylation of large T antigen. *Mol Cell Biol* 22, 7907-7918.
- Xu, Y., Ahn, J. H., Cheng, M., apRhyas, C. M., Chiou, C. J., Zong, J., Matunis, M. J., and Hayward, G. S. (2001). Proteasome-independent disruption of PML oncogenic domains (PODs), but not covalent modification by SUMO-1, is required for human cytomegalovirus immediate-early protein IE1 to inhibit PML-mediated transcriptional repression. *J Virol* 75, 10683-10695.
- Xu, Z. X., Zhao, R. X., Ding, T., Tran, T. T., Zhang, W., Pandolfi, P. P., and Chang, K. S. (2004). Promyelocytic leukemia protein 4 induces apoptosis by inhibition of survivin expression. *J Biol Chem* 279, 1838-1844.
- Yang, X.-J., Ogryzko, V. V., Nishikawa, J., Howard, B. H., and Nakatani, Y. (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 382, 319-324.
- Yaniv, M. (1979). Construction of hybrid viruses in vitro and their possible use for the production of specific viral or cellular proteins. *Dev Biol Stand* 42, 87-91.
- Yankiwski, V., Marciniak, R. A., Guarente, L., and Neff, N. F. (2000). Nuclear structure in normal and Bloom syndrome cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5214-5219.
- Yao, T. P., Ku, G., Zhou, N., Scully, R., and Livingston, D. M. (1996). The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10626-10631.
- Yew, P. R., and Berk, A. J. (1992). Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature* 357, 82-85.
- Yew, P. R., Liu, X., and Berk, A. J. (1994). Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. *Genes Dev* 8, 190-202.
- Zantema, A., Schrier, P. I., Davis, O. A., van Laar, T., Vaessen, R. T., and van der Eb, A. J. (1985). Adenovirus serotype determines association and localization of the large E1B tumor antigen with cellular tumor antigen p53 in transformed cells. *Mol Cell Biol* 5, 3084-3091.

Zhang, Q., Yao, H., Vo, N., and Goodman, R. H. (2000). Acetylation of adenovirus E1A regulates binding of the transcriptional corepressor CtBP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14323-14328.

Zhang, X., Turnell, A. S., Gorbea, C., Mymryk, J. S., Gallimore, P. H., and Grand, R. J. (2004). The targeting of the proteasomal regulatory subunit S2 by adenovirus E1A causes inhibition of proteasomal activity and increased p53 expression. *J Biol Chem* 279, 25122-25133.

Zhang, Y., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (1997). Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell* 89, 357-364.

Zhang, Y., and Jones, C. (2001). The bovine herpesvirus 1 immediate-early protein (bICP0) associates with histone deacetylase 1 to activate transcription. *J Virol* 75, 9571-9578.

Zhong, L., and Hayward, G. S. (1997). Assembly of complete, functionally active herpes simplex virus DNA replication compartments and recruitment of associated viral and cellular proteins in transient cotransfection assays. *J Virol* 71, 3146-3160.

Zhong, S., Muller, S., Ronchetti, S., Freemont, P. S., Dejean, A., and Pandolfi, P. P. (2000). Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* 95, 2748-2752.

Zhu, J., Lallemand-Breitenbach, V., and de The, H. (2001). Pathways of retinoic acid- or arsenic trioxide-induced PML/RARalpha catabolism, role of oncogene degradation in disease remission. *Oncogene* 20, 7257-7265.

Zhuo, S., Clemens, J. C., Hakes, D. J., Barford, D., and Dixon, J. E. (1993). Expression, purification, crystallization, and biochemical characterization of a recombinant protein phosphatase. *J Biol Chem* 268, 17754-17761.

Zimber, A., Nguyen, Q. D., and Gespach, C. (2004). Nuclear bodies and compartments: functional roles and cellular signalling in health and disease. *Cell Signal* 16, 1085-1104.

DANKSAGUNG

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

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

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Thomas Dobner für seine sehr engagierte Anleitung und Unterstützung dieser Arbeit bedanken. Seine Begeisterung für wissenschaftliche Fragestellungen und seine Bereitschaft, diese offen und unermüdlich zu diskutieren, haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Allen meinen Arbeitskollegen danke ich für die sehr angenehme und freundschaftliche Atmosphäre. Für den wunderbaren Zusammenhalt und die Hilfsbereitschaft möchte ich mich ganz herzlich bei Timo Sieber, Peter Groitl, Orkide Dirlik, Emre Koyuncu, Kathrin Kindsmüller, Barbara Härtl, Sylvia Allmeyer, Dagmar Büchner, Michael Rothmund und den „Ehemaligen“ Birgitt Täuber-Rusch, André Rusch, Thomas Zeller, Arnd Dankesreiter, Markus Hoffmann und Paola Blanchette bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Christina Paulus und Michael Nevels für ihre wertvollen Ratschläge und Reagenzien.

Bei allen Institutsmitgliedern, insbesondere bei meinen Kollegen am Forschungszentrum, bedanke ich mich für das sehr angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Meinen Eltern danke ich für ihr Vertrauen in mich.

Dir, liebe Esther, danke ich für die wunderbare Zeit.