



Analysen zur Funktion des E1B-55K-Proteins  
von Adenovirus Typ 5 im lytischen  
Replikationszyklus



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

vorgelegt von  
**Kathrin Kindsmüller**  
aus Gammelsdorf

Mai 2006

Die vorliegende Arbeit wurde selbstständig  
und ohne unzulässige Hilfe angefertigt.

---

Kathrin Kindsmüller

Promotionsgesuch eingereicht am: 24.05.2006

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Charalampos Aslanidis und PD. Dr. Thomas Dobner

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Reinhard Wirth (Vorsitzender)  
Prof. Dr. Charalampos Aslanidis (1. Prüfer, Erstgutachten)  
PD Dr. Thomas Dobner (2. Prüfer, Zweitgutachten)  
Prof. Dr. Herbert Tschochner (3. Prüfer)



# Inhaltsverzeichnis

---

---

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>V</b>
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2 EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Adenoviren</b>	<b>4</b>
2.1.1 Klassifikation	4
2.1.2 Struktur und Genomorganisation	5
2.1.3 Onkogenes Potenzial humaner Adenoviren	7
2.1.4 Produktiver Infektionszyklus	8
<b>2.2 Funktionen von E1B-55K in Adenovirus-infizierten Zellen</b>	<b>10</b>
2.2.1 Inhibition der p53-vermittelten Transkriptionsaktivierung	11
2.2.2 Der E1B-55K/E4orf6-Komplex vermittelt den selektiven Kernexport viraler mRNA	12
2.2.3 Funktionen von E1B-55K bei der Translationskontrolle	15
2.2.4 Der E1B-55K/E4orf6-Komplex veranlasst den proteasomalen Abbau von p53 und Mre11	16
<b>2.3 Aufgabenstellung</b>	<b>20</b>
<b>3 MATERIAL</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Zellen</b>	<b>21</b>
3.1.1 Bakterienstämme	21
3.1.2 Säugerzelllinien	21
<b>3.2 Adenoviren</b>	<b>22</b>
<b>3.3 Nukleinsäuren</b>	<b>23</b>
3.3.1 Oligonukleotide	23
3.3.2 Vektoren	24

# INHALTSVERZEICHNIS

---

3.3.3	Rekombinante Plasmide	25
<b>3.4</b>	<b>Antikörper</b>	<b>26</b>
3.4.1	Primärantikörper	26
3.4.2	Sekundärantikörper	27
<b>3.5</b>	<b>Kommerzielle Systeme</b>	<b>28</b>
<b>3.6</b>	<b>Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterial</b>	<b>29</b>
<b>3.7</b>	<b>Größen- und Molekulargewichtsstandards</b>	<b>29</b>
<b>3.8</b>	<b>Computerprogramme und Datenbanken</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>METHODEN</b>	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Bakterien</b>	<b>30</b>
4.1.1	Kulturbedingungen und Lagerung	30
4.1.2	Transformation von <i>E. coli</i>	31
<b>4.2</b>	<b>Säugerzellen</b>	<b>33</b>
4.2.1	Vermehrung und Aufbewahrung von Zellen	33
4.2.2	Lagerung von Säugerzellen	34
4.2.3	Bestimmung der Gesamt-Zellzahl	34
4.2.4	Transfektion von Säugerzellen	35
4.2.5	Ernte von Säugerzellen	36
<b>4.3</b>	<b>Adenoviren</b>	<b>37</b>
4.3.1	Gewinnung von Virus aus DNA	37
4.3.2	Herstellung und Lagerung hochtitriger Virusstocks	37
4.3.3	Titerbestimmung von Virusstocks	38
4.3.4	Infektion mit Adenoviren	39
4.3.5	Bestimmung der Ausbeute an Virusnachkommen	40
<b>4.4</b>	<b>DNA-Techniken</b>	<b>41</b>
4.4.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	41
4.4.2	Konzentrationsbestimmung von DNA	42
4.4.3	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	42
4.4.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	43
4.4.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	43

# INHALTSVERZEICHNIS

---

4.4.6	Klonierung von DNA-Fragmenten	45
<b>4.5</b>	<b>RNA-Techniken</b>	<b>47</b>
4.5.1	Vermeidung RNase-induzierten RNA-Abbaus	47
4.5.2	Präparation von RNA aus Säugerzellen	47
4.5.3	Konzentrationsbestimmung von RNA	48
4.5.4	Herstellung Digoxigenin-gekoppelter cRNA-Sonden	48
4.5.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA	49
4.5.6	<i>Northern Blot</i>	50
<b>4.6</b>	<b>Protein-Techniken</b>	<b>52</b>
4.6.1	Zellaufschluss	52
4.6.2	Quantitative Bestimmung von Proteinkonzentrationen	54
4.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	54
4.6.4	<i>Western Blot</i>	56
4.6.5	Immunpräzipitation	58
4.6.6	Immunfluoreszenz	60
<b>4.7</b>	<b>Reporterversuche</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>63</b>
<b>5.1</b>	<b>Klonierungssystem zur Herstellung von Adenoviren, die Punktmutationen in der E1- bzw. E4-Region tragen</b>	<b>63</b>
<b>5.2</b>	<b>Charakterisierung der Virusmutanten H5pm4101, H5pm4102 und H5pm4103</b>	<b>65</b>
5.2.1	Mutationen im NES führen zu einer erhöhten SUMO1-Modifikation des E1B-55K-Proteins	66
5.2.2	Mutationen im NES und SKM führen zu einer veränderten subzellulären Lokalisation von E1B-55K in infizierten Zellen	68
5.2.3	Mutationen im NES und SKM haben keinen Einfluss auf die virale DNA-Synthese	76
5.2.4	Mutationen im NES und SKM haben keinen Einfluss auf die Produktion später viraler Strukturproteine und Nachkommenviren	77
5.2.5	Mutationen im SKM erhöhen die Exporteffizienz von adenoviraler L5-mRNA	80
5.2.6	Mutationen im NES von E1B führen zu einem verminderten Abbau von p53, nicht aber von Mre11 in infizierten Zellen	82
<b>5.3</b>	<b>Charakterisierung der Virusmutanten H5pm4101, H5pm4116 und H5pm4119</b>	<b>87</b>
5.3.1	Herstellung von Ad5 E4orf6-Mutanten	88

# INHALTSVERZEICHNIS

---

5.3.2	Mutationen im NES von E4orf6 führen zu einer verringerten E4orf6-Gleichgewichtsmenge im Verlauf der Virusinfektion	88
5.3.3	Mutationen im NES von E4orf6 verändern die subzelluläre Lokalisation von E1B-55K in infizierten Zellen	90
5.3.4	Die Inhibition des CRM1-abhängigen nukleären Exports von E1B und E4orf6 hat keinen Einfluss auf die virale DNA-Synthese	93
5.3.5	Mutationen im E4orf6-NES führen zu einer verzögerten viralen Strukturproteinsynthese und verminderten Produktion an Nachkommenviren	94
5.3.6	Mutationen im NES von E4orf6 führen zu einer leicht verminderten Exporteffizienz später viraler mRNAs	97
5.3.7	E1B-55K bindet an APRIL, E4orf6 an pp32	100
5.3.8	E1B-55K bindet an Aly/REF	102
5.3.9	Mutationen im NES von E4orf6 vermindern den proteasomalen Abbau von p53 und Mre11 in infizierten Zellen	107
<b>5.4</b>	<b>Charakterisierung der Virusmutanten H5pm4109, H5pm4127 und H5pm4143</b>	<b>109</b>
5.4.1	Mutationen in der Virusmutante H5pm4143 verringern E1B-55K-Gleichgewichtsmengen	110
5.4.2	H260A- und C454S/C456S-Mutationen verhindern den proteasomalen Abbau von Mre11 und p53	112
5.4.3	H260A- und C454S/C456S-Mutationen haben keinen Einfluss auf die virale DNA-Synthese	114
5.4.4	Erhöhte Mre11- und p53-Mengen korrelieren mit einer reduzierten Produktion später viraler Proteine und Nachkommenviren	115
5.4.5	H260A- und C454S/C456S-Mutationen führen zu einer reduzierten Mengen an später L5-mRNA, haben aber keinen Einfluss auf deren Export	118
<b>5.5</b>	<b>Identifizierung und Charakterisierung von zwei neuen E1B-Isoformen</b>	<b>120</b>
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>129</b>
<b>6.1</b>	<b>Funktionen von E1B-55K und E4orf6 während der produktiven Infektion</b>	<b>129</b>
6.1.1	Die Konjugation mit SUMO1 reguliert die subnukleäre Lokalisation und einen CRM1-unabhängigen Exportweg von E1B-55K	129
6.1.2	Die CRM1- und SUMO1-regulierte Exportfunktion von E1B-55K steuert nicht den Kerntransport später viraler mRNAs	133
6.1.3	Die CRM1-abhängige Exportfunktion von E1B-55K und E4orf6 ist nicht wichtig für den Transport später viraler mRNAs	134



# INHALTSVERZEICHNIS

---

6.2	Der Transport später viraler mRNAs wird vermutlich über einen CRM1-unabhängigen Exportweg vermittelt	136
6.3	Mutationen im NES von E4orf6 führen zu einem verminderten Abbau von p53 und Mre11	142
6.3.1	Defekte im p53- und Mre11-Abbau führen zu einer verminderten adenoviralen Replikation	144
6.4	Die 48K/49K-Isoformen des E1B-Proteins sind ausreichend um die virale Replikation zu unterstützen	149
7	LITERATURVERZEICHNIS	153

VERÖFFENTLICHUNGEN

DANKSAGUNG

# Abkürzungen

---

Ad	Adenovirus
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäurerest
bid.	bidest
Bp	Basenpaare
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
F <sub>ab</sub>	Anteil des Ig-Moleküls
FA	Formaldehyd-Agarose
ffu	Fluoreszenz-bildende Einheiten ( <i>fluorescence forming units</i> )
fw	<i>forward</i>
h p.i.	Stunden nach Infektionsbeginn ( <i>hours post infection</i> )
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobase
kBp	Kilobasenpaar
K	Kilodalton
moi	Multiplizität der Infektion ( <i>multiplicity of infection</i> )
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
orf	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Saline ( <i>phosphate buffered saline</i> )
rev	<i>reverse</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Aktivitätseinheit von Enzymen)
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumenanteil pro Gesamtvolumen ( <i>volume per volume</i> )
w/v	Gewichtsanteil pro Gesamtvolumen ( <i>weight per volume</i> )
wt	Wildtyp

# 1 Zusammenfassung

---

---

Das 55K-Genprodukt der frühen Transkriptionseinheit 1B (E1B-55K) von Adenovirus Typ 5 ist ein multifunktionelles Phosphoprotein, das eine zentrale Rolle im produktiven Replikationszyklus von Ad5 einnimmt. Den lytischen Aktivitäten des E1B-Proteins liegen unterschiedliche Wirkmechanismen zugrunde, die zumindest teilweise im Komplex mit dem viralen Protein E4orf6 vermittelt werden. Soweit bekannt fördert der E1B-55K/E4orf6-Komplex (E1B/E4-Komplex) den nukleozytoplasmatischen Transport viraler mRNAs und fördert somit die Synthese viraler Kapsidproteine bzw. die Produktion von Nachkommenviren. Darüber hinaus werden dem E1B/E4-Komplex auch posttranslationale Funktionen beim proteasomalen Abbau des zellulären Tumorsuppressorproteins p53 und dem zellulären DNA-Reparaturkomplex MRN (Mre11, Rad50, NBS1) zugeordnet. Es gibt erste Hinweise, dass beide Aktivitäten mit einer nukleozytoplasmatischen Pendelfunktion in Verbindung stehen, die über ein CRM1-abhängiges Leucin-reiches Kernexportsignal (NES) in beiden viralen Proteinen und ein zum E1B-NES eng benachbartes SUMO1 (*small ubiquitin-like modifier 1*)-Konjugationsmotiv (SKM) reguliert wird.

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit Untersuchungen zur Funktion der E1B-55K- und E4orf6-Proteine in der Regulation des produktiven Replikationszyklus von Ad5, und insbesondere mit Fragestellungen zur Regulation des viralen mRNA-Transports durch den E1B/E4-Komplex. Dazu wurden im ersten Schritt, mit Hilfe eines direkten Klonierungsverfahrens, Mutationen in die kodierenden Bereiche der E1B- und/oder E4orf6-Gene im Ad5-Genom eingeführt, die zu Aminosäureaustauschen in: (1) den NESs von E1B-55K und/oder E4orf6, (2) im SKM von E1B-55K und (3) in den p53- bzw. MRN-Interaktionsdomänen von E1B-55K führen. Anschließend wurde der Einfluss der Mutationen auf die virale Replikation durch genetisch-virologische und biochemische Verfahren überprüft. Insgesamt bestätigen diese Versuche die Annahme, dass E1B-55K und vermutlich der E1B-55K/E4orf6-Komplex in lytisch infizierten

Zellen kontinuierlich über den Exportrezeptor CRM1 aus dem Zellkern transportiert wird. Im Unterschied zu E4orf6 führen Mutationen im E1B-NES zu einer fast vollständigen Restriktion des viralen Proteins im Zellkern, wo das virale Protein an der Peripherie der sog. viralen Replikationszentren akkumuliert. Interessanterweise wird die nukleäre Restriktion und Lokalisation an den viralen Replikationszentren durch die gleichzeitige Mutation des SKM vollständig aufgehoben. Diese Beobachtungen zeigen erstmals, dass E1B-55K posttranslational durch SUMOylierung an die Orte der viralen DNA-Synthese, Transkription und RNA-Prozessierung dirigiert wird und lassen zudem vermuten, dass die Konjugation mit SUMO1 einen CRM1-unabhängigen Exportweg des viralen Proteins reguliert.

Trotz der deutlich veränderten Lokalisation des E1B-55K-Proteins haben Mutationen im E4orf6- und/oder E1B-NES sowie im E1B-SKM keinen negativen Einfluss auf die zytoplasmatische Akkumulation viraler Transkripte, Synthese später Strukturproteine, Produktion von Nachkommenviren und den proteasomalen Abbau von MRN. Dieser Befund ist überraschend und widerspricht vollständig der momentan vorherrschenden Modellvorstellung. Obwohl die molekulare Grundlage dieser Ergebnisse noch unklar ist, zeigen die Untersuchungen dieser Arbeit, dass der nukleäre Export von E1B-55K und E4orf6 auch über die CRM1-unabhängigen RNA-Exportrezeptoren HuR und/oder TAP/NXF1 gesteuert wird, da sowohl die HuR-Liganden pp32 und APRIL als auch das TAP/NXF1-Adaptorprotein Aly/REF1 an den E1B/E4-Komplex binden. Während pp32 bekanntermaßen über E4orf6 mit dem E1B/E4-Komplex wechselwirkt, zeigen Koimmunpräzipitationsversuche erstmalig, dass APRIL und Aly/REF1 über E1B-55K mit dem viralen Proteinkomplex interagieren. Eine direkte Beteiligung von Aly/REF1 am RNA-Exportvorgang wird durch Immunfluoreszenzanalysen unterstützt, die zeigen, dass das RNA-bindende hnRN-Protein an die Peripherie der viralen Replikationszentren rekrutiert wird. Außerdem wurden Hinweise erhalten, dass sowohl p53 als auch MRN an diesen Vorgängen direkt oder indirekt beteiligt sind, da der Verlust des proteasomalen Abbaus dieser zellulären Faktoren über den E1B/E4-Komplex mit einer Reduktion später viraler mRNAs und einer stark verringerten Synthese später viraler Proteine

sowie Produktion von Nachkommenviren korreliert.

Weiterhin wurden im Verlauf dieser Arbeit erstmals zwei neue Isoformen des E1B-55K-Proteins (E1B-48K und E1B-49K) identifiziert. Nach einem vorläufigen Modell werden diese aminoterminal verkürzten E1B-Proteine aufgrund einer sog. *internal ribosomal entry site* (IRES) und/oder durch den Vorgang des *leaky scanning* während der Translation der E1B-55K-mRNA gebildet. Die Phänotypisierung einer E1B-55K-negativen Virusmutante, die nur E1B-48K und E1B-49K bildet, zeigt, dass die Expression beider Isoformen für die effiziente virale Replikation ausreichen.

## 2 Einleitung

---

### 2.1 Adenoviren

#### 2.1.1 Klassifikation

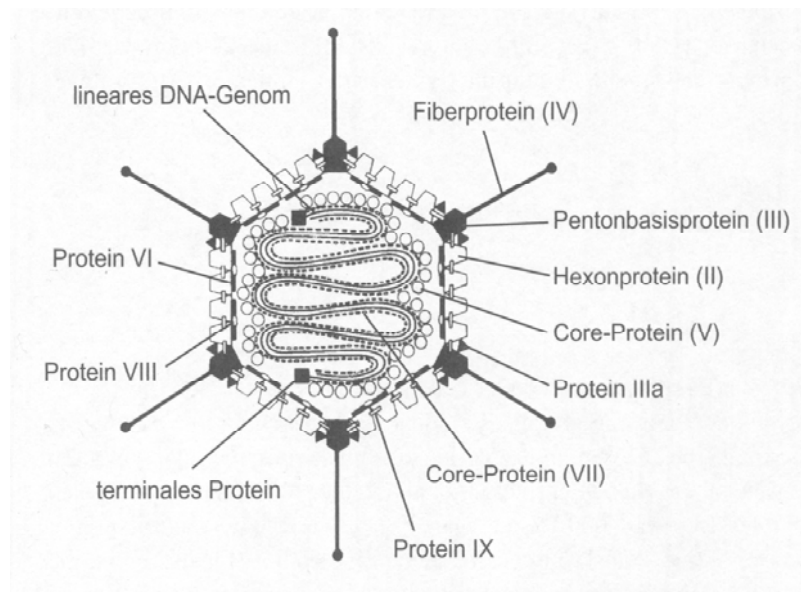
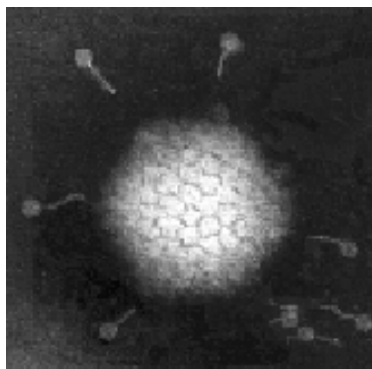
Adenoviren wurden erstmals zu Beginn der fünfziger Jahre des letzten Jahrhunderts aus adenoidem Gewebe und dem Rachensekret respiratorisch erkrankter Personen isoliert (Rowe *et al.*, 1953; Hilleman und Werner, 1954). Die Virusisolate wurden anfangs nach ihren Krankheitsbildern, wie *acute respiratory disease* (ARD), *adenoid-pharyngeal-conjunctival* (APC), *respiratory illness* (RI) oder einfach *adenoid degeneration* (AD) bezeichnet. Seit 1956 fasste man sie aufgrund gemeinsamer Merkmale und Eigenschaften zur Gruppe der Adenoviren zusammen (Huebner *et al.*, 1954; Enders *et al.*, 1956).

Aufgrund ihres Wirtsspektrums wird die Familie der *Adenoviridae*, die derzeit über 100 verschiedene, serologisch unterscheidbare Virustypen umfasst, weiter in 4 Gattungen unterteilt: Aviadenoviren der Vögel, Atadenoviren der Reptilien, Siadenoviren der Amphibien und Mastadenoviren, zu denen die Adenoviren der Säuger, einschließlich der bis heute bekannten 51 verschiedenen humanen Serotypen gehören (zur Übersicht: Horwitz, 1996; Davison *et al.*, 2003). Außerdem wurde die Einführung einer fünften Gattung, die Ichtadenoviren der Fische vorgeschlagen (Benkö *et al.*, 2002).

Humane Adenoviren sind weltweit mit hoher Prävalenz verbreitet und verursachen sowohl lytische als auch persistierende Infektionen und sind mit einer Vielzahl klinischer Symptome assoziiert. Die Krankheitsbilder umfassen dabei okuläre, respiratorische und gastroenterale Erkrankungen, Zystitis, persistierende Harnwegsinfektionen, Hepatitis und Meningoenzephalitis. Bei immunsupprimierten Personen können Adenovirusinfektionen auch zum Tode führen (zur Übersicht: Horwitz, 1996; Modrow und Falke, 1997).

## 2.1.2 Struktur und Genomorganisation

Adenoviren bestehen aus einem 80 – 110 nm großen ikosaedrischen Proteinkapsid ohne Membranhülle und enthalten ein 34 – 44 kbp langes doppelsträngiges lineares DNA-Genom (zur Übersicht: Shenk, 2001). Die 252 Untereinheiten des Kapsids setzen sich aus 240 Hexonen und 12 Pentonen zusammen (Abb. 1; Stewart *et al.*, 1993). Die eckständigen Pentone sind nicht-kovalent mit Fiberproteinen verknüpft und bilden ein Charakteristikum der Adenoviruskapside, die antennenartigen Fortsätze (*spikes*). Diese ermöglichen die Adsorption des Virus an den Rezeptor der Wirtszelle. Der bevorzugte Rezeptor von Subgruppe C Adenoviren ist identisch mit dem für Coxsackie B Viren und wurde daher als Coxsackie/Adenovirus Rezeptor (CAR) bezeichnet (Bergelson *et al.*, 1997). Zur Aufnahme des Virus in die Zellen durch Rezeptor-vermittelte Endozytose spielt auch das Pentonbasisprotein eine wichtige Rolle, welches den Kontakt zu den Integrinen der Zelloberfläche herstellt (Wickham *et al.*, 1993; Mathias *et al.*, 1994; Wickham *et al.*, 1994).

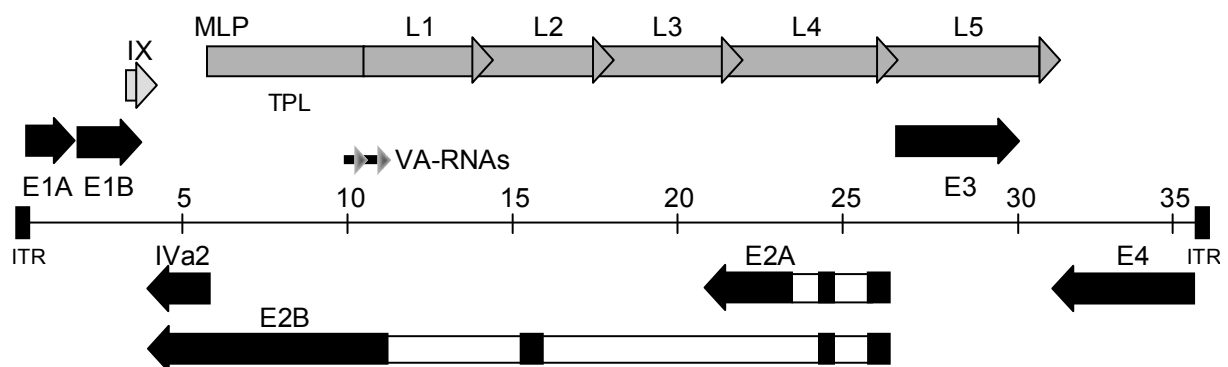


**Abb. 1 Schematische Darstellung eines Adenovirus**

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

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

Zu den bis heute am ausführlichsten untersuchten Adenoviren gehören die nah verwandten Serotypen 2 und 5 (Ad2 und Ad5) der Subgruppe C. Das in Abbildung 2 dargestellte Genom von Ad5 enthält 9 Transkriptionseinheiten, die für etwa 40 verschiedene regulatorische und strukturelle Proteine und zwei RNAs (*virus-associated RNAs*, VA-RNAs) kodieren. Sequenzvergleiche mit anderen Serotypen zeigen, dass alle humanen Adenoviren eine ähnliche Genomorganisation besitzen und nahezu den gleichen Satz an Genprodukten exprimieren (zur Übersicht: Shenk, 2001).



**Abb. 2 Die Genomorganisation von Ad5**

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



### 2.1.3 Onkogenes Potenzial humaner Adenoviren

Obwohl Adenoviren bislang nicht überzeugend mit der Entstehung menschlicher Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht werden konnten (Mackey *et al.*, 1976; Mackey *et al.*, 1979; Wold *et al.*, 1979; Chauvin *et al.*, 1990), waren sie die ersten humanpathogenen Viren für die kanzerogene Eigenschaften im Tiermodell nachgewiesen wurden. Trentin und Mitarbeiter konnten 1962 erstmals zeigen, dass Adenovirus Serotyp 12 (Ad12) nach subkutaner Injektion in neugeborene Hamster die Bildung von undifferenzierten Sarkomen verursacht (Trentin *et al.*, 1962). Ähnliche Beobachtungen mit anderen Nagetieren und die Erkenntnis, dass nicht alle adenoviralen Serotypen tumorigen sind, führten zu einer neuen Klassifizierung der 51 heute bekannten humanen Serotypen in sechs Subgruppen (A bis F). Die Einteilung basiert hauptsächlich auf dem onkogenen Potenzial der Viren in Nagetieren, aber auch auf einigen weiteren Merkmalen, wie Hämagglutination, GC-Gehalt und Sequenzhomologien der viralen DNA (Tab. 1; zur Übersicht: Graham, 1984; Shenk, 2001). Virustypen der Subgruppe A sind hochonkogen, während die Vertreter der Subgruppe B schwach onkogen sind und nur ineffizient und nach langer Inkubationszeit Tumoren in Nagetieren induzieren. Viren der Subgruppe C bis F werden heute als nicht onkogen eingestuft. Eine Ausnahme bilden jedoch die Serotypen Ad9 und Ad10 der Subgruppe D, die mammarkarzinomähnliche Tumoren in den Brustdrüsen weiblicher Ratten induzieren (Ankerst und Jonsson, 1989; Javier *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 2001).

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

ONKOGENITÄT IN TIEREN	SUBGRUPPE	SEROTYPEN	ART DES TUMORS
hoch onkogen	A	12, 18, 31	undifferenzierte Sarkome
	D	9, 10	Fibroadenome
schwach onkogen	B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35	undifferenzierte Sarkome
nicht onkogen	C - F	C (1, 2, 5, 6); D (8, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51); E (4); F (40, 41)	keine

Interessanterweise sind aber alle humanen Adenoviren, die auf diese Eigenschaft hin untersucht wurden, in der Lage primäre Nagetierzellen in Gewebekultur zu transformieren (zur Übersicht: Nevins und Vogt, 1996). Die transformierten Zellen, die nicht mehr der Kontaktinhibition und der Verankerungsabhängigkeit unterliegen, wachsen als dichte, mehrschichtige Zellkolonien. Es können jedoch nicht alle dieser transformierten Zelllinien nach Inokulation in Nagetiere Tumoren erzeugen. Ihre Tumorigenität variiert in Abhängigkeit vom Virustyp und dem Immunstatus des Versuchstiers (Graham, 1984; Williams *et al.*, 1995; Shenk, 2001). Zellen, die mit Adenoviren des Subgenus A transformiert wurden, erzeugen in immunkompetenten Nagetieren ein Tumorwachstum, während Zellen, die mit Adenoviren des Subgenus C transformiert wurden, dasselbe tumorigene Potenzial nur in immunsupprimierten (thymusdefizienten) Ratten aufweisen. Dies zeigt, dass die Tumorigenität von Adenovirus-transformierten Zellen hauptsächlich von den thymusabhängigen CTL-Komponenten des Immunsystems der Wirtstiere beeinflusst wird (Raska und Gallimore, 1982; Bernards *et al.*, 1983; Cook und Lewis, 1987). Obwohl die molekularen Grundlagen der Transformationsfähigkeit bei Nagetierzellen noch weitgehend unbekannt sind (Hutton *et al.*, 2000; Shenk, 2001), deutet die Anwesenheit der E1-Onkoproteine in allen Ad- und Plasmid-transformierten Zellen darauf hin, dass die Integration der E1-Region in das Wirtszellgenom eine Voraussetzung für die Initiation der Transformation der Zellen sein könnte. Neueren Daten zufolge muss aber auch die Möglichkeit zusätzlicher Mechanismen, die eine Tumorbildung durch Adenovirus-transformierte Zellen fördern und durch virale Genprodukte der E4-Region beeinflusst werden, in Erwägung gezogen werden (zur Übersicht: Täuber und Dobner, 2001a; Endter und Dobner, 2004).

### **2.1.4 Produktiver Infektionszyklus**

Humane Adenoviren infizieren *in vivo* ein großes Spektrum unterschiedlicher Zellen. Bevorzugte Zielzellen sind postmitotisch ruhende, terminal differenzierte Epithelzellen des Hals-, Nasen- und 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 (zur Übersicht: Modrow und Falke, 1997; Shenk, 2001).

Der produktive Infektionszyklus wird in eine frühe und eine späte Phase unterteilt, die *per conventionem* durch das Einsetzen der viralen DNA-Synthese getrennt sind. In der frühen Phase erfolgt nach Adsorption, Penetration und Kernimport des viralen DNA-Protein-Komplexes die Transkription und Translation bestimmter früher Gene. Dabei werden in einer zeitlich koordinierten Reihenfolge über 20 regulatorische Proteine der frühen Transkriptionseinheiten E1A, E1B, E2, E3 und E4 exprimiert. 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. Vor allem der Eintritt von G<sub>0</sub>-Zellen in die S-Phase und die Zellzyklusprogression durch die E1A- und E1B-Proteine ist für die virale Replikation essenziell, da den Viren nur in sich teilenden Zellen ein genügend großes Repertoire an Molekül-Bausteinen zur Verfügung steht. Die Fähigkeit der E1A- und E1B-Polypeptide zelluläre Wachstumskontrollmechanismen zu modulieren, bildet die molekulare Grundlage ihres transformierenden Potenzials. Die Proteine E1B-19K und E1B-55K blockieren außerdem verschiedene antivirale Schutzmechanismen der Wirtszelle, wie z.B. Apoptose. Die frühe Transkriptionseinheit E2 kodiert für Proteine, die eine wichtige Funktion in der Replikation viraler DNA haben. Dazu gehören u. a. die viruseigene DNA-Polymerase, das DNA-bindende Protein (E2A-72K) und das terminale Protein, das kovalent mit den 5'-Enden des Virusgenoms verknüpft ist (zur Übersicht: Shenk, 2001). Die Proteine der E3-Region besitzen hauptsächlich modulatorische Funktionen, die das Erkennen und vorzeitige Eliminieren von virusinfizierten Zellen durch das Immunsystem des Wirtsorganismus verhindern (zur Übersicht: Gooding und Wold, 1990; Mathews und Shenk, 1991; Burgert und Blusch, 2000). Die E4-Region kodiert für mindestens sechs verschiedene Polypeptide, die durch alternatives Spleißen aus dem primären E4-Transkript entstehen und nach Anordnung des jeweiligen offenen Leserahmens als E4orf1, E4orf2, E4orf3, E4orf4, E4orf6

und E4orf6/7 bezeichnet werden. Ein weiteres Protein könnte E4orf3/4 darstellen, das jedoch bisher in infizierten Zellen nicht nachgewiesen werden konnte. Die E4-Proteine besitzen vielfältige Funktionen, die für eine effiziente virale Replikation benötigt werden (zur Übersicht: Täuber und Dobner, 2001b).

Das Einsetzen der viralen DNA-Replikation markiert den Anfang der späten Phase des lytischen Infektionszyklus, in dem die Transkription der späten Transkriptionseinheit (MLTU, *major late transcription unit*) vom späten Promotor (MLP, *major late promoter*) beginnt. Aus der MLTU, einer einzigen ca. 29 kb großen Vorläufer-mRNA, entstehen durch differenzielles Spleißen schließlich fünf Gruppen verschieden langer mRNAs (L1 bis L5), die hauptsächlich für Strukturproteine des ikosaedrischen Kapsids, darunter Fiber und Hexon kodieren. Diese mRNAs besitzen alle einen gemeinsamen 5'-nichtkodierenden Bereich, der als *tripartite leader* (TPL) bezeichnet wird. Wesentlicher Bestandteil der späten Phase ist das Abschalten der zellulären Proteinsynthese (*host shut-off*), während virale mRNAs weiter translatiert werden. Weitere Veränderungen in der späten Phase sind die Reorganisation des Zellkerns (Puvion-Dutilleul *et al.*, 1995), unter anderem hervorgerufen durch die massive Akkumulation viraler DNA, sowie die gezielte Umstrukturierung des Zytoskeletts der Wirtszelle (Defer *et al.*, 1990). Am Ende des produktiven Replikationszyklus, der in Gewebekultur nach etwa 24 Stunden endet, wird die Wirtszelle passiv lysiert, wobei je nach Serotyp bis zu 10.000 Viruspartikel freigesetzt werden (zur Übersicht: Modrow und Falke, 1997; Shenk, 2001).

## 2.2 Funktionen von E1B-55K in Adenovirus-infizierten Zellen

Das Ad5-Protein der frühen Transkriptionseinheit 1B (E1B-55K) ist ein 496 AS großes multifunktionelles Phosphoprotein, das ein Molekulargewicht von etwa 55 K besitzt. Während die Funktionen der meisten regulatorischen Genprodukte auf eine bestimmte Phase im lytischen Infektionszyklus beschränkt sind, werden die Eigenschaften des E1B-55K-Proteins sowohl in der frühen als auch in der späten Phase einer produktiven Virusinfektion benötigt. Untersuchungen der letzten Jahre ergaben,

dass das E1B-Protein modulatorische Funktionen auf transkriptioneller, posttranskriptioneller, translationaler und posttranslationaler Ebene besitzt und somit essenziell für die Virusreplikation ist.

### 2.2.1 Inhibition der p53-vermittelten Transkriptionsaktivierung

In der frühen Phase der Infektion kann das E1B-55K-Protein über zwei zentrale Bereiche an das Tumorsuppressorproteins p53 binden und so dessen transaktivierende Funktion hemmen (Sarnow *et al.*, 1982a; Kao *et al.*, 1990; Yew *et al.*, 1990; Yew und Berk, 1992; Shen *et al.*, 2001). Das p53-Protein wirkt als Transkriptionsfaktor, der die Genexpression sowohl aktivieren als auch reprimieren kann. Dies führt zu einer Arretierung des Zellwachstums bzw. zur Induktion von Apoptose (Ginsberg *et al.*, 1991; Farmer *et al.*, 1992; Martin und Berk, 1998). Für die E1B-55K-induzierte Aufhebung dieser p53-vermittelten Transaktivierung könnte die Fähigkeit des adenoviralen Proteins von Bedeutung sein, die basale Aktivität des zellulären RNA-Polymerase II-Komplexes stark zu reprimieren (Yew *et al.*, 1994; Martin und Berk, 1998). Wahrscheinlich wird diese Verringerung der Transkription durch die Interaktion von E1B-55K mit einem zellulären Korepressor vermittelt (Martin und Berk, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass durch die spezifische Interaktion von Ad2 E1B-55K mit HDAC1/mSin3A die Deacetylierung von Histonen katalysiert wird, was wiederum die Genexpression regulieren kann (Punga und Akusjärvi, 2000). Außerdem wurde beobachtet, dass Ad2 E1B-55K und Ad12 E1B-54K mit einer weiteren Acetyltransferase PCAF, wechselwirkt, die physikalische Interaktion mit p53 inhibiert und dadurch die Acetylierung von p53 verhindert, was zu einem fast vollständigen Verlust der sequenzspezifischen DNA-Bindungsaktivität von p53 führt (Liu *et al.*, 2000). Beide Wechselwirkungen könnten zur Inaktivierung von p53 führen. Zudem konnte gezeigt werden, dass das E1B-55K-Protein an drei C-terminalen AS (S490/491, T495) phosphoryliert wird, was ebenfalls notwendig für die reprimierenden Eigenschaften von E1B ist (Teodoro *et al.*, 1994; Teodoro und Branton, 1997).

## 2.2.2 Der E1B-55K/E4orf6-Komplex vermittelt den selektiven Kernexport viraler mRNA

Das Abschalten der zellulären Proteinsynthese (*host shut-off*) ist eines der auffälligsten Ereignisse der späten Phase des adenoviralen Replikationszyklus. Dieser Effekt wird zwei Prozessen zugeschrieben, die additiv wirken. Zum einen findet ein Exportblock zellulärer Transkripte statt, wohingegen virale mRNAs weiterhin effizient aus dem Kern transportiert werden. Zum anderen wird die Initiation der Translation zellulärer mRNAs gehemmt, wobei virale Transkripte dieser Inhibition entkommen (zur Übersicht: Dobner und Kzhyshkowska, 2001; Flint und Gonzalez, 2003).

Erste Hinweise auf einen regulierten mRNA-Export in Adenovirus-infizierten Zellen ergaben sich aus der Analyse zweier Virusmutanten (*dl1520* und *H5dl355*), die kein E1B- bzw. kein E4orf6-Protein exprimieren (Halbert *et al.*, 1985; Weinberg und Ketner, 1986; Barker und Berk, 1987). Da in den jeweiligen Mutanten die Akkumulation später viraler Transkripte im Zytoplasma deutlich reduziert ist, sind diese Proteine im Wildtypvirus maßgeblich am effizienten Export viraler mRNAs beteiligt (Babiss *et al.*, 1985; Bridge und Ketner, 1989). Zudem wurde gezeigt, dass beide Proteine miteinander interagieren (Sarnow *et al.*, 1984; Rubenwolf *et al.*, 1997). In einer Doppelmutante, die weder E4orf6 noch E1B-55K exprimiert, konnten keine stärkeren Defekte im mRNA-Transport beobachtet werden als in den jeweiligen Einzelmutanten (Cutt *et al.*, 1987; Bridge und Ketner, 1990). Daraus wurde geschlossen, dass der E1B-55K/E4orf6-Proteinkomplex für den bevorzugten nukleozytoplasmatischen Export viraler mRNA verantwortlich ist, während der Transport der meisten zellulären Transkripte inhibiert wird (Babich *et al.*, 1983; Babiss und Ginsberg, 1984; Babiss *et al.*, 1985; Pilder *et al.*, 1986b; Williams *et al.*, 1986). Der genaue Mechanismus dieses Transportvorgangs ist jedoch noch unklar. Der Einfluss des E1B-55K/E4orf6-Komplexes auf den mRNA-Transport scheint nach der Transkription und dem Prozessieren, aber vor dem Transport durch die Kernpore zu entstehen (Leppard und Shenk, 1989). Zudem ist der Export ungespleißter Transkripte stärker von E1B-55K abhängig als der Export kurzer und vollständig gespleißter mRNAs (Leppard, 1993). Die Selektivität des Transports ist zwar unabhängig von der Herkunft und Sequenz

der RNA (Gaynor *et al.*, 1984; Hearing und Shenk, 1985), wird aber durch das Vorhandensein des TPL verbessert (Huang und Flint, 1998). Zudem hängt der Kernexport mit der Aktivierung der Transkription in der späten Phase der Infektion zusammen (Moore *et al.*, 1987; Leppard, 1993; Yang *et al.*, 1996).

Ornelles und Shenk beobachteten 1991, dass in virusinfizierten Zellen beim Fehlen von E4orf6 das E1B-55K-Protein nicht in die viralen Transkriptions- und Replikationszentren gelangt. Daraufhin schlugen sie ein Modell vor, das die Aktivierung des viralen und gleichzeitige Hemmung des zellulären mRNA-Transports zu erklären versucht: Der E1B-55K/E4orf6-Komplex bindet an einen zellulären RNA-Exportfaktor und bringt diesen in die viralen Zentren der Transkription und Replikation. Auf diese Weise verarmt die Zelle an diesem limitierenden Faktor und die zellulären mRNAs können nicht mehr transportiert werden (Ornelles und Shenk, 1991). Tatsächlich konnte ein zelluläres Protein, E1B-AP5 (E1B-assoziiertes Protein 5) identifiziert werden, das *in vitro* und in virusinfizierten Zellen an das E1B-55K-Protein bindet (Gabler *et al.*, 1998). E1B-AP5 ist ein nukleäres RNA-bindendes Protein, das zur Familie der hnRNP-Proteine gehört, die an der Prozessierung von mRNA beteiligt sind und auch eine wichtige Rolle beim mRNA-Transport spielen (zur Übersicht: Izaurrealde und Mattaj, 1995). Weitere Hinweise auf die Beteiligung von E1B-AP5 am Export zellulärer mRNA ergaben sich durch Untersuchungen des zellulären Proteins TAP (*Tip-associated protein*) oder NXF1 (*nuclear export factor 1*), welches mit einer Vielzahl von Komponenten des Kernporenkomplexes wechselwirkt und den Export verschiedener mRNA-Spezies, darunter auch den überwiegenden Teil (ca. 75 %) der zellulären mRNA vermittelt (Bachi *et al.*, 2000). Während der Export von mRNAs einfacher Retroviren, wie z. B. der des *Mason-Pfizer monkey virus* (MPMV), die ein *constitutive transport element* (CTE) enthalten durch die direkte Wechselwirkung mit TAP/NXF1 vermittelt wird (Bray *et al.*, 1994; Gruter *et al.*, 1998), wird zelluläre mRNA durch Koadaptoren in den Exportprozess eingeschleust (Erkman und Kutay, 2004).

Die Entdeckung, dass sowohl E1B-55K (Krätzer *et al.*, 2000; Dosch *et al.*, 2001) als auch E4orf6 (Dobbelstein *et al.*, 1997; Weigel und Dobbelstein, 2000) nukleozytoplasmatische Pendelaktivität besitzen, ließ ein anderes Modell für den adenoviralen mRNA-

Transport entstehen, das in Analogie zum CRM1-vermittelten mRNA-Export in HIV-1 (*human immunodeficiency virus type 1*)-infizierten Zellen steht. Das HI-Virus ermöglicht den selektiven Export viraler ungespleißter mRNAs mit Hilfe des Rev-Proteins, das selektiv an spezifische RNA-Sequenzen (*Rev responsive elements*) bindet. Zudem kann das Rev-Protein über ein Leucin-reiches nukleäres Exportsignal (NES; Fischer *et al.*, 1995) mit dem zellulären Exportrezeptor CRM1 (*chromosomal region maintenance protein 1*; Adachi und Yanagida, 1989) wechselwirken und somit die Translokation der mRNA durch die Kernpore bewirken (zur Übersicht: Hauber, 2001; Cullen, 2003b; Cullen, 2003a).

Für Adenoviren wurde nach der Entdeckung eines HIV-1 Rev-ähnlichen Leucin-reichen NES im E4orf6-Protein ein Modell vorgeschlagen, bei dem E4orf6 den Kernexport des E1B-55K/E4orf6-Komplexes und somit der adenoviralen mRNA vermittelt. Außerdem enthält E4orf6 eine Arginin-reiche amphipatische  $\alpha$ -Helix, die für die Kernretention verantwortlich ist. E1B-55K besitzt diesem Modell zufolge keine eigene Exportaktivität, sondern ermöglicht durch die Maskierung des Kernretentions-signals von E4orf6 den Export des Komplexes (Dobbelstein *et al.*, 1997; Weigel und Dobbelstein, 2000). Neuere Ergebnisse zeigen jedoch, dass das E1B-55K-Protein unabhängig von E4orf6 mit Hilfe eines eigenen aminoterminalen NES des HIV-1 Rev-Typs den Kernexport vermitteln kann (Krätzer *et al.*, 2000; Dosch *et al.*, 2001). Das E1B-55K-Protein enthält außerdem am Carboxyterminus ein mögliches Kernlokalisations-signal (NLS; *nuclear localization signal*), dessen genaue Lage jedoch noch unklar ist (Krätzer *et al.*, 2000). Neuere Untersuchungen zeigen, dass das E1B-55K-Protein durch kovalente Bindung mit SUMO1 (*small ubiquitin-like modifier 1*) modifiziert werden kann (Endter *et al.*, 2001). SUMO1 gehört zur Familie der Ubiquitin-ähnlichen Proteine, die an eine Vielzahl zellulärer aber auch viraler Substratproteine kovalent angeheftet werden. Dies bewirkt hauptsächlich eine veränderte Affinität zu anderen Proteinen, was in vielen Fällen eine Veränderung der Lokalisation und/oder der Aktivität zur Folge hat (Melchior, 2000; Müller *et al.*, 2001; Wilson und Rangasamy, 2001; Pichler und Melchior, 2002). Endter *et al.* konnten zeigen, dass die SUMO1-Modifikation des E1B-55K-Proteins sowohl für die nukleäre Akkumulation des



viralen Proteins als auch für die Steuerung innerhalb des Zellkerns zu spezifischen Regionen essenziell ist. Daraus kann man schließen, dass die Konjugation mit SUMO1 zusammen mit dem nukleären Exportsignal an der nukleozytoplasmatischen Pendelaktivität des E1B-55K-Proteins beteiligt ist (Endter *et al.*, 2001).

Trotz dieser vielfältigen Beobachtungen konnte bisher jedoch kein Mechanismus identifiziert werden, über den spezifisch adenovirale Transkripte aus dem Kern exportiert werden, während zelluläre im Kern zurückgehalten werden.

### 2.2.3 Funktionen von E1B-55K bei der Translationskontrolle

Im Rahmen des *host shut-off* wird nicht nur der Export, sondern auch die Translation zellulärer Transkripte inhibiert, während virale mRNAs effizient translatiert werden (Beltz und Flint, 1979). Wesentlicher Bestandteil des Abschaltens der zellulären Proteinsynthese ist die Inaktivierung des Initiationsfaktors eIF-4E, der für die Translation von Transkripten mit einer 5'-*Cap*-Struktur erforderlich ist (Huang und Schneider, 1990; Huang und Schneider, 1991). Normalerweise wird eIF-4E durch Phosphorylierung aktiviert, bindet an das 5'-*Cap* von mRNAs und erleichtert so die Initiation der Translation. In der späten Phase der Adenovirusinfektion ist die Phosphorylierung von eIF-4E stark reduziert und es kann nur noch *Cap*-unabhängige Translation stattfinden. Virale Transkripte besitzen zwar ebenfalls ein 5'-*Cap*, können jedoch dank ihres TPLs unabhängig von eIF-4E weiter translatiert werden (Logan und Shenk, 1984; Dolph *et al.*, 1988; Dolph *et al.*, 1990). In Zellen, die mit E1B-defizienten Viren infiziert wurden, bleibt der Initiationsfaktor eIF-4E phosphoryliert (Zhang *et al.*, 1994). Man vermutete daher, dass das E1B-55K-Protein an der Dephosphorylierung von eIF-4E und somit an der Regulation der Translation beteiligt sein könnte (Harada und Berk, 1999). Neueste Untersuchungen zeigen jedoch, dass dies vermutlich nur ein Sekundäreffekt der Infektion mit E1B-deletierten Viren ist. Es konnte gezeigt werden, dass das späte adenovirale Protein L4-100K für die Inhibition der Phosphorylierung von eIF-4E verantwortlich ist (Cuesta *et al.*, 2004) und somit auch die entscheidende Rolle bei der selektiven Translation viraler Transkripte spielt (Xi *et al.*, 2004; Xi *et al.*, 2005). Da jedoch das E1B-55K-Protein an L4-100K binden kann (Orkide Koyuncu,

persönliche Mitteilung), könnte es sein, dass E1B über diese Wechselwirkung einen Einfluss auf die selektive Translation später viraler Transkripte ausübt.

### **2.2.4 Der E1B-55K/E4orf6-Komplex veranlasst den proteasomalen Abbau von p53 und Mre11**

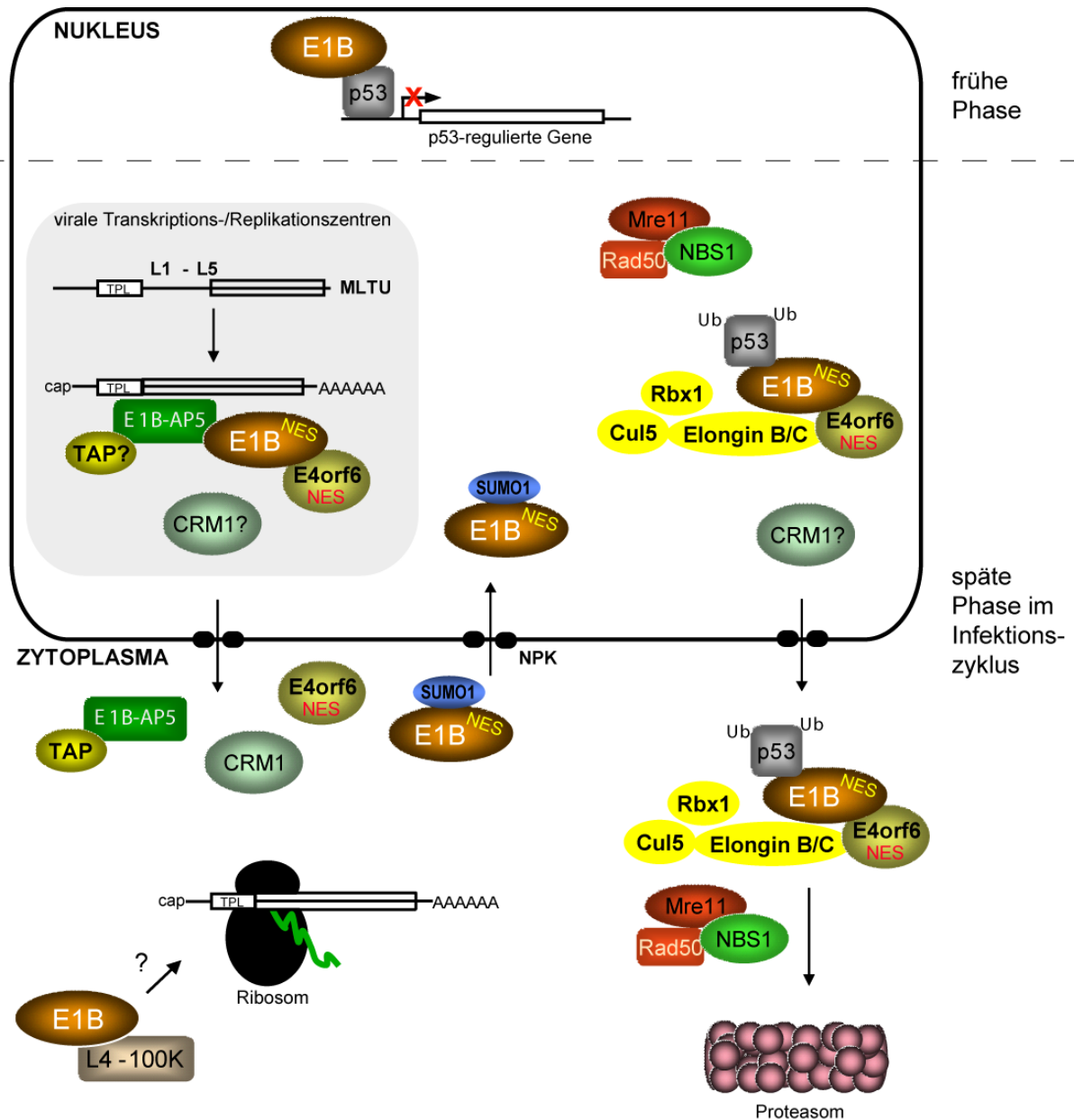
Der E1B-55K/E4orf6-Proteinkomplex reguliert die virale Genexpression auch auf posttranslatiöner Ebene, indem er den proteasomalen Abbau der zellulären Proteine p53 und Mre11 veranlasst (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997; Querido *et al.*, 1997; Steegenga *et al.*, 1998; Querido *et al.*, 2001a; Querido *et al.*, 2001b; Harada *et al.*, 2002; Stracker *et al.*, 2002; Blanchette *et al.*, 2004).

Der Abbau des Tumorsuppressorproteins p53 ist für den viralen Infektionszyklus vermutlich entscheidend, da die E1A-Genprodukte die Fähigkeit besitzen Apoptose einzuleiten, indem sie die Akkumulation und Aktivierung von p53 induzieren (White, 1998). In Wildtypvirus-infizierten Zellen, in denen sowohl das E1B-55K- als auch das E4orf6-Protein exprimiert werden, nimmt die Menge an p53, deutlich ab, wohingegen in Abwesenheit eines dieser beiden viralen Proteine der Tumorsuppressor akkumuliert (Grand *et al.*, 1994; Querido *et al.*, 1997; Ridgway *et al.*, 1997; Steegenga *et al.*, 1998). Der Abbau von p53 ist von der erfolgreichen Wechselwirkung des E1B-55K-Proteins mit p53 selbst und mit E4orf6 abhängig (Roth *et al.*, 1998; Cathomen und Weitzman, 2000; Querido *et al.*, 2001b; Shen *et al.*, 2001). Zudem spielt das 26S-Proteasom bei der Degradation von p53 durch den E1B-55K/E4orf6-Komplex eine Rolle, da der Abbau durch die Zugabe von Proteasomeninhibitoren verhindert werden kann (Roth *et al.*, 1998; Steegenga *et al.*, 1998). Neueste Untersuchungen konnten zeigen, dass E1B-55K zusammen mit E4orf6 und einer Reihe weiterer zellulärer Proteine (Cullin-5, Rbx1/RCO1/Hrt1, Elongin B und C) eine SCF-ähnliche E3-Ubiquitin-Ligase bildet, deren Funktion die Ubiquitinylierung von Proteinen ist. Dabei stellt E4orf6 die Verbindung zum E3-Ligasekomplex her, während E1B-55K vermutlich als Substratlieferant dient (Querido *et al.*, 2001a; Harada *et al.*, 2002; Blanchette *et al.*, 2004). Unklar ist jedoch noch, ob der Abbau von p53 an nukleären oder zyttoplasmatischen Proteasomen stattfindet (Harada *et al.*, 2002).

Zusätzlich zur Interaktion mit p53 konnte kürzlich ein weiteres Polypeptid identifiziert werden, das mit E1B wechselwirkt und dem Abbau zugeführt wird. Es handelt sich hierbei um das Mre11-Protein (Stracker *et al.*, 2002), einem Bestandteil des Mre11-Rad50-NBS1 (MRN)-Multienzymkomplexes. Dieser MRN-Komplex ist an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, der meiotischen Rekombination und der Erhaltung der Telomere beteiligt (Carney *et al.*, 1998; Haber, 1998; Petrini, 1999; Zhu *et al.*, 2000).

Stracker *et al.* konnten zeigen, dass diesem Komplex auch eine Bedeutung während der adenoviralen Replikation zukommt. Wird der MRN-Komplex nicht inhibiert, führt seine Aktivität zur Konkaterisierung der doppelsträngigen viralen DNA-Genome und somit zu einer Reduktion infektiöser Nachkommenviren (Stracker *et al.*, 2002). Frühere Experimente zeigten ebenfalls, dass E4-deletierte Adenoviren eine starke Konkaterbildung aufwiesen (Weiden und Ginsberg, 1994; Boyer *et al.*, 1999). Zwei Proteine der E4-Region, E4orf3 und E4orf6, besitzen redundante Funktionen bei der Steuerung der viralen DNA-Replikation (zur Übersicht: Täuber und Dobner, 2001b) und sind beide dazu in der Lage, die Konkaterbildung zu hemmen (Weiden und Ginsberg, 1994). Da das Auftreten von Konkateren auch in der Virusmutante *dl1016*, der das E4orf3- und das E1B-55K-Protein fehlt, beobachtet werden kann (Stracker *et al.*, 2002), und da das E4orf6-Protein einen multifunktionellen Komplex mit dem E1B-55K-Protein bildet (Bridge und Ketner, 1990), nimmt man an, dass sowohl das E4orf3-Protein als auch der E1B-55K/E4orf6-Komplex die Verknüpfung der viralen Genome verhindern können. Das E4orf3-Protein hemmt den Multiprotein-komplex, indem es seine subzelluläre Lokalisation ändert und dieser so seine Funktionen nicht mehr erfüllen kann. Der E1B-55K/E4orf6-Komplex dagegen veranlasst den Abbau des Mre11-Rad50-NBS1-Komplexes. Da dieser durch Proteasomeninhibitoren verhindert werden kann, findet die Degradation wie auch bei p53 über einen Ubiquitin-Proteasomen-abhängigen Weg statt (Stracker *et al.*, 2002).

In Abbildung 3 sind die Funktionen des E1B-55K-Proteins bzw. des E1B-55K/E4orf6-Komplexes während der produktiven Infektion zusammengefasst und graphisch dargestellt. Insgesamt spielt das E1B-55K-Protein eine sehr wichtige Rolle bei der Transkription, indem es p53-aktivierte Gene inhibiert, beim selektiven mRNA-Transport später viraler Transkripte sowie beim Abbau verschiedener zellulärer Proteine, wie p53 und Mre11. Zudem könnte E1B-55K zusammen mit dem späten adenoviralen Protein L4-100K die Translation später viraler mRNAs regulieren. Diese vielfältigen Funktionen zeigen, dass E1B-55K essenziell für die produktive Infektion von Ad5 ist. Adenovirus-Mutanten, die kein funktionelles E1B-55K-Protein exprimieren, zeigen erhebliche Defekte beim Transport und der Translation später viraler Transkripte, was zu einer verringerten Produktion später viraler Strukturproteine und Nachkommenviren im Vergleich zum Wildtypvirus führt (Beltz und Flint, 1979; Babich *et al.*, 1983; Babiss und Ginsberg, 1984; Babiss *et al.*, 1985; Pilder *et al.*, 1986b; Williams *et al.*, 1986; Yew *et al.*, 1990).



**Abb. 3 Funktionen des E1B-55K-Proteins**

In der frühen Phase der Infektion bindet das E1B-55K-Protein im Zellkern an das Tumorsuppressormprotein p53 und hemmt dessen transaktivierende Funktion und somit Apoptose und Zellzyklusarretierung. Im Komplex mit dem E4orf6-Protein kann E1B-55K in der späten Phase der Infektion den selektiven Transport viraler mRNA vom Zellkern ins Zytoplasma bewirken. Der für den RNA-Transport verantwortliche Exportrezeptor konnte bisher jedoch noch nicht identifiziert werden. Im Zytoplasma reguliert das adenovirale Protein L4-100K die *Cap*-unabhängige Translation viraler mRNAs. Ob E1B-55K dabei eine Rolle spielt ist ebenfalls noch unklar. Der Rücktransport des E1B-55K-Proteins in den Zellkern wird durch die kovalente Verknüpfung mit SUMO1 erleichtert. Zudem kann E1B-55K zusammen mit E4orf6 und weiteren zellulären Proteinen eine SCF-ähnliche E3-Ubiquitin-Ligase bilden, die die Ubiquitinylierung von p53 und Mre11 katalysiert und somit den proteasomalen Abbau dieser Proteine induziert. NES: nukleäres Exportsignal; NPK: nukleärer Porenkomplex; TPL: tripartite leader; Ub: Ubiquitinreste.

### 2.3 Aufgabenstellung

Primäres Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion der E1B-55K- und E4orf6-Proteine bzw. des E1B-55K/E4orf6-Komplexes in der differenziellen Steuerung des nukleozytoplasmatischen Transports zellulärer und viraler mRNAs weiter aufzuklären.

Auf der Basis der bisher vorliegenden Daten sollte dazu an erster Stelle die Rolle der CRM1-abhängigen Exportfunktion der viralen Proteine in der Regulation des lytischen Replikationszyklus von Ad5 untersucht werden. Dazu sollten mit Hilfe eines direkten Klonierungsverfahrens, Mutationen in die kodierenden Bereiche der E1B-55K- und/oder E4orf6-Gene im Ad5-Genom eingeführt werden, die zu Aminosäureaustauschen in: (1) den NESs von E1B-55K und/oder E4orf6, (2) im SKM von E1B-55K und (3) in den p53- bzw. MRN-Interaktionsdomänen von E1B-55K führen. Die Virusmutanten sollten dann im zeitlichen Verlauf der Infektion hinsichtlich des viralen mRNA-Transports, der Synthese später viraler Strukturproteine und der Produktion von Nachkommenviren in verschiedenen Zelllinien phänotypisiert werden. Die In-vivo-Studien sollten durch biochemische Analysen zellulärer Faktoren ergänzt werden, die bekanntermaßen eine zentrale Rolle in mRNA-Transportvorgängen spielen und möglicherweise, analog zu p53 und Mre11, durch den E1B-55K/E4orf6/E3-Ligasekomplex posttranslational destabilisiert werden.

Insgesamt sollen diese Arbeiten zu neuen Erkenntnissen führen, die zur Steuerung des produktiven Replikationszyklus humaner Adenoviren auf der posttranskriptionellen bzw. posttranslationalen Ebene beitragen und gleichzeitig das Verständnis über grundlegende molekulare Prozesse des nukleozytoplasmatischen mRNA-Transports in Säugerzellen erweitern. Diese könnten hinsichtlich potenzieller Zusammenhänge zwischen Virusinfektionen und menschlichen Tumorerkrankungen von Bedeutung sein.

## 3 Material

---

---

### 3.1 Zellen

#### 3.1.1 Bakterienstämme

---

BEZEICHNUNG	MERKMAL
TOP10	F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ , $\phi 80lacZ\Delta M15$ , $\Delta lacX74$ , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara-leu)7697$ , <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>
XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , [F' <i>proAB</i> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15, <i>Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> )] (Bullock, 1987)
XL2-Blue	<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> <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15, <i>Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> ), <i>Amy</i> , <i>Cam<sup>r</sup></i> ] (Bullock, 1987)
GM2163	F- <i>dam-13::Tn9</i> , <i>dcm6</i> , <i>hsdR2</i> , <i>leuB6</i> , <i>his4</i> , <i>thi1</i> , <i>ara14</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>xyl5</i> , <i>mtl1</i> , <i>rpsL136</i> , <i>tonA31</i> , <i>tsc78</i> , <i>supE44</i> , <i>mcrA-</i> , <i>mcrB-</i> (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Göttingen)

---

#### 3.1.2 Säugerzelllinien

---

BEZEICHNUNG	MERKMAL
911	Ad5-transformierte, humane, embryonale Retinoblastom-Zelllinie. Die E1-Region ist stabil im Genom integriert und exprimiert die adenoviralen E1A- und E1B-Genprodukte (Fallaux <i>et al.</i> , 1996).
HeLa	Humane Zervixkarzinom-Zelllinie (Gey <i>et al.</i> , 1952).
A549	Humane Lungenkarzinom-Zelllinie, Wildtyp p53 (Giard <i>et al.</i> , 1973).
H1299	Humane, p53-negative Lungenkarzinom- Zelllinie (Mitsudomi <i>et al.</i> , 1992).
H1299S	Humane, p53-negative Lungenkarzinom-Zelllinie. Exprimiert das E4orf6-Protein (Stammsammlung der Arbeitsgruppe).
MCF7	Humane Mammakarzinom-Zelllinie, Überexpression von <i>mdm2</i> , Wildtyp p53 (Soule <i>et al.</i> , 1973).

---

## 3.2 Adenoviren

BEZEICHNUNG	MERKMAL
H5dl309	Wildtyp Ad5 mit einer Deletion (nt 30005 bis nt 30750) der E3-Region (Jones und Shenk, 1979).
dl1520	Ad2/ Ad5-chimäres Virus, das ein Stoppkodon an AS-Position 3 und eine 827 Bp lange Deletion (nt 2496 bis 3323) im orf des E1B-55K-Gens enthält (Barker und Berk, 1987).
H5dl355	E4orf6-Mutante, die eine 14 Bp lange Deletion im orf des E4orf6-Gens enthält (Halbert <i>et al.</i> , 1985).
H5pg4100	Wildtyp Ad5 mit einer 1863 Bp langen Deletion (nt 28602 bis nt 30465) des E3-Leserahmens (Stammsammlung der Arbeitsgruppe).
H5pm4101	E1B-55K-Mutante mit 3 AS-Austauschen im NES an den Positionen 83, 87 und 91 (L83A, L87A und L91A) im H5pg4100-Rückgrat (Kindsmüller, 2002).
H5pm4102	E1B-55K-Mutante mit einem AS-Austausch im SKM an Position 104 (K104R) im H5pg4100-Rückgrat (Kindsmüller, 2002).
H5pm4103	E1B-55K-Mutante mit AS-Austauschen im NES (L83A, L87A und L91A) und im SKM (K104R) im H5pg4100-Rückgrat (Kindsmüller, 2002).
H5pm4109	E1B-55K-Mutante mit einem AS-Austausch an Position 260 (H260A) im H5pg4100-Rückgrat (diese Arbeit).
H5pm4116	E4orf6-Mutante mit 2 AS-Austauschen im NES an den Positionen 90 und 92 (L90A und I92A) im H5pg4100-Rückgrat (diese Arbeit).
H5pm4119	E1B-55K/E4orf6-Mutante mit AS-Austauschen im NES des E1B-55K-Proteins (L83A, L87A und L91A) und im NES des E4orf6-Proteins (L90A und I92A) im H5pg4100-Rückgrat (diese Arbeit).
H5pm4127	E1B-55K-Mutante mit AS-Austauschen an den Positionen 454 und 456 (C454S und C456S) im H5pg4100-Rückgrat (diese Arbeit)
H5pm4133	E1B-55K-Mutante mit zwei Stoppkodons an den AS-Positionen 3 und 8 im H5pg4100-Rückgrat (diese Arbeit).
H5pm4143	E1B-55K-Mutante mit AS-Austauschen an den Positionen 260, 454 und 456 (H260A, C454S und C456S) im H5pg4100-Rückgrat (diese Arbeit).



### 3.3 Nukleinsäuren

#### 3.3.1 Oligonukleotide

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

#	BEZEICHNUNG	SEQUENZ	VERWENDUNG
64	<b>E1B bp2043 fwd</b>	CGC GGG ATC CAT GGA GCG AAG AAA CCC ATC TGA GC	virale DNA-Replikation
110	<b>E1B 361-389 rev</b>	CGG TGT CTG GTC ATT AAG CTA AAA	virale DNA-Replikation
390	<b>E4orf6 NES fwd</b>	CGC GGG AGG AGG CTG TAG CCC TGA GGA AGT GTA TGC	Mutagenisierung
391	<b>E4orf6 NES fwd</b>	GCA TAC ACT TCC TCA GGG CTA CAG CCT CCT CCC GCG	Mutagenisierung
592	<b>E1B55-SUfw-324</b>	CTA AAG GGG GTA AGG AGG GAG CGG GGG	Mutagenisierung
593	<b>E1B55-SUrev-300</b>	CCC CCG CTC CCT CCT TAC CCC CTT TAG	Mutagenisierung
594	<b>E1B55-NESfw-284</b>	GTG GCT GAA GCG TAT CCA GAA GCG AGA CGC ATT GCG ACA ATT ACA	Mutagenisierung
595	<b>E1B55-NESrev-240</b>	TGT AAT TGT CGC AAT GCG TCT CGC TTC TGG ATA CGC TTC AGC CAC	Mutagenisierung
635	<b>pcDNA3-forw</b>	ATG TCG TAA CAA CTC CGC	Sequenzierung
780	<b>Seq E1-Box fwd 1251bp</b>	GTC CTG TGT CTG AAC CTG AGC	Sequenzierung
781	<b>Seq E1-Box fwd 1582bp</b>	GAT TGC GTG TGT GGT TAA CGC	Sequenzierung
782	<b>Seq E1-Box fwd 2454bp</b>	CAA GGA TAA TTG CGC TAA TGA GC	Sequenzierung
783	<b>Seq E1B-Box rev 3373bp</b>	CCA CAC TCG CAG GGT CTG C	Sequenzierung
840	<b>E4orf6 fwd 32246bp</b>	GCA GAT CTG TTT GTC ACG CC	Sequenzierung

## MATERIAL

---



---

862	<b>E1B H260A fwd</b>	CCA ACC TTA TCC TAG CCG GTG TAA GCT TC	Mutagenisierung
863	<b>E1B H260A rev</b>	GAA GCT TAC ACC GGC TAG GAT AAG GTT GG	Mutagenisierung
924	<b>C454S/C456S fwd</b>	CCA GGT GCA GAC CCT CCG AGT CTG GCG GTA AAC ATA TTA GG	Mutagenisierung
925	<b>C454S/C456S rev</b>	CCT AAT ATG TTT ACC GCC AGA CTC GGA GGG TCT GCA CCT GG	Mutagenisierung
996	<b>TPL3 [9697-9720]fwd</b>	CTC TCG AGA AAG GCG TCT AAC CAG	Amplifikation
1101	<b>T7-Prom</b>	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Sequenzierung
1147	<b>E1B-55K knockout fw</b>	GGA TAA ATG GAG TGA AGA AAC CCA TCT TAG CGG GGG GTA CC	Mutagenisierung
1148	<b>E1B-55K knockout rev</b>	GGT ACC CCC CGC TAA GAT GGG TTT CTT CAC TCC ATT TAT CC	Mutagenisierung
1162	<b>fiberlcRE</b>	CCC AAG CTA CCA GTG GCA GTA	Amplifikation
1216	<b>mRNA L4-100K rev</b>	GCG CAC TCA TGA CTG TGC TCA	Amplifikation
1285	<b>E1B-55K ATG(64) fwd</b>	CGG CAG GAG CAG AGC CCG TGG AAC CCG AGA GC	Mutagenisierung
1286	<b>E1B-55K ATG(64) rev</b>	GCT CTC GGG TTC CAC GGG CTC TGC TCC TGC CG	Mutagenisierung
1287	<b>E1B-55K ATG(75) fwd</b>	GGC CTG GAC CCT CGG GAG TGA ATG TTG TAC AGG	Mutagenisierung
1288	<b>E1B-55K ATG(75) rev</b>	CCT GTA CAA CAT TCA CTC CCG AGG GTC CAG GCC	Mutagenisierung
1318	<b>E1Bseq 978-999</b>	GGC CTC CGA CTG TGG TTG CTT C	Sequenzierung

---

### 3.3.2 Vektoren

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

## MATERIAL

#	BEZEICHNUNG	VERWENDUNG	REFERENZ
136	<b>pcDNA3</b>	Expressionsvektor für Säugerzellen, CMV-Promotor	Invitrogen
180	<b>pRL-TK</b>	Expressionsvektor mit <i>Renilla</i> -Luziferase, SV40 TK-Promotor	Promega
	<b>pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup></b>	TA-Klonierungsvektor	Invitrogen

### 3.3.3 Rekombinante Plasmide

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

#	BEZEICHNUNG	VEKTOR	FREMDGEN-EXPRESSION	REFERENZ
2	<b>pC53SN3</b>	pCMV/neo	humanes p53 cDNA	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
499	<b>pRE-LUC</b>	unbekannt	CMV-Promotor, fünf p53-Bindungsstellen	N. Horikoshi
1154	<b>Ad5pTG-S2 (Noah)</b>	pTG	Ad5 Genom	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1155	<b>E4-Box-S2</b>	pPG-S2	Ad5 E4-Region	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1170	<b>E4-Box E4orf6-NES</b>	pPG-S2	Ad5 E4-Region	diese Arbeit
1173	<b>Ad5pPG-S2E4orf6-NES</b>	pPG-S2	Ad5 Genom	diese Arbeit
1235	<b>E1-Box pPG-S3</b>	pPG-S3	Ad5 E1-Region	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1244	<b>E1-Box H260A</b>	pPG-S3	Ad5 E1-Region	diese Arbeit
1252	<b>Ad5pPG-S2 H260A</b>	pPG-S2	Ad5 Genom	diese Arbeit
1267	<b>E1-Box C454SC456S</b>	pPG-S3	Ad5 E1-Region	diese Arbeit
1319	<b>pcDNA-E1B-55K</b>	pcDNA3	Ad5 E1B-55K	Stammsammlung der

## MATERIAL

				Arbeitsgruppe
1325	Ad5pPG-S2 DNES	pPG-S2	Ad5 Genom	diese Arbeit
1390	E1-Box E1B-55K-	pPG-S3	Ad5 E1-Region	diese Arbeit
1397	Ad5pPG-S2 E1B-55K-	pPG-S2	Ad5 Genom	diese Arbeit
1606	E1-Box C454SC456S/H260A	pPG-S3	Ad5 E1-Region	diese Arbeit
1608	Ad5pPG-S2 E1B-C454SC456S	pPG-S2	Ad5 Genom	diese Arbeit
1630	Ad5pPG-S2 E1B-C454SC456S/H260A	pPG-S2	Ad5 Genom	diese Arbeit
1631	pcDNA-E1B-55K „minus“	pcDNA3	Ad5 E1B-55K	diese Arbeit
1670	pcDNA-E1B-55K „minus“ M64V	pcDNA3	Ad5 E1B-55K	diese Arbeit
1671	pcDNA-E1B-55K „minus“ M75V	pcDNA3	Ad5 E1B-55K	diese Arbeit
1672	pcDNA-E1B-55K „minus“ M64V M75V	pcDNA3	Ad5 E1B-55K	diese Arbeit
1773	pCR Fiber	pCRII	Ad5 Fiber cDNA	diese Arbeit
1774	pCR L4-100K	pCRII	Ad5 L4-100K cDNA	diese Arbeit

### 3.4 Antikörper

#### 3.4.1 Primärantikörper

BEZEICHNUNG	EIGENSCHAFTEN
1807	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das E4orf6-Protein von Ad5 (Boivin <i>et al.</i> , 1999)
2A6	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das E1B-55K-Protein von Ad5 (Sarnow <i>et al.</i> , 1982b)
6A11	Monoklonaler Ratten-Antikörper gegen das E4orf3-Protein von Ad5 (Nevels <i>et al.</i> , 1999b).
6B10	Monoklonaler Ratten-Antikörper gegen das L4-100K-Protein von Ad5 (Stammsammlung der Arbeitsgruppe)

## MATERIAL

---

---

7C11	Monoklonaler Ratten-Antikörper gegen das E1B-55K-Protein von Ad5 (Stammsammlung der Arbeitsgruppe)
$\alpha$ -APRIL	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen APRIL (Dr. Joachim Hauber, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg)
$\alpha$ -Aly/REF1	Polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen Aly/REF1 (Rodrigues <i>et al.</i> , 2001)
$\alpha$ -SUMO1 (21C7)	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das SUMO1-Protein (Zymed)
$\alpha$ -late	Polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen späte Strukturproteine von Ad5 (Stammsammlung der Arbeitsgruppe)
$\alpha$ -Mre11	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das humane Mre11-Protein (Abcam; Katalog-Nummer: ab397).
$\alpha$ -pp32	Polyklonaler Ziegen-Antikörper gegen pp32 (I1PP2A; Santa Cruz Biotechnology)
$\alpha$ -p53 (DO1)	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen ein aminoterminales Epitop von p53 des Menschen (Santa Cruz Biotechnology; Vojtesek <i>et al.</i> , 1992)
$\beta$ -actin (AC-15)	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen $\beta$ -Actin (Sigma).
B6-8	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das E2A-72K-Protein von Ad5 (Reich <i>et al.</i> , 1983)
RSA3	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen den Aminoterminus des E4orf6- und E4orf6/7-Proteins von Ad5 (Marton <i>et al.</i> , 1990)

---

### 3.4.2 Sekundärantikörper

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

BEZEICHNUNG	EIGENSCHAFTEN
HRP-Anti-Maus IgG	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> , HRP) gekoppelter Antikörper gegen Maus IgGs aus Schaf (Amersham Life Science)
HRP-Anti-Ratte IgG	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> , HRP) gekoppelter Antikörper gegen Ratte IgGs aus Ziege (Amersham Life Science)
HRP-Anti-Kaninchen IgG	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> , HRP) gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen IgGs aus Esel (Amersham Life Science)

---

## MATERIAL

Folgende Sekundärantikörper wurden für Immunfluoreszenzanalysen verwendet:

BEZEICHNUNG	EIGENSCHAFTEN
FITC-Anti-Ratte IgG	Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-gekoppelter Antikörper gegen Ratte IgGs aus Esel; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (H + L; Dianova)
FITC-Anti-Maus IgG	Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-gekoppelter Antikörper gegen Maus IgGs aus Esel; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (H + L; Dianova)
FITC-Anti-Kaninchen IgG	Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen IgGs aus Esel; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (H + L; Dianova)
<i>Texas Red</i> -Anti-Ratte IgG	<i>Texas Red</i> (TR)-gekoppelter Antikörper gegen Ratte IgGs aus Esel; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (H + L; Dianova)
<i>Texas Red</i> -Anti-Maus IgG	<i>Texas Red</i> (TR)-gekoppelter Antikörper gegen Maus IgGs aus Esel; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (H + L; Dianova)
Alexa™ 488 Anti-Maus IgG	Alexa™ 488 Antikörper gegen Maus IgGs aus Ziege (H + L; F(ab') <sub>2</sub> Fragment; Molecular Probes)

### 3.5 Kommerzielle Systeme

Folgende kommerzielle Systeme wurden verwendet:

BEZEICHNUNG	HERSTELLER
Protein Assay	BioRad
TOPO TA Cloning®	Invitrogen
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce
Plasmid Purification Mini, Midi und Maxi Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)	Roche

### **3.6 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterial**

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

### **3.7 Größen- und Molekulargewichtsstandards**

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Molekülen in Agarosegelen wurde die *1 kb DNA ladder* (Gibco BRL), für RNA-Gele wurde die *1 kb RNA ladder* (Gibco BRL) verwendet. Für die Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen bei der SDS-Gelelektrophorese wurde der *Precision Protein Standard* (BioRad) verwendet.

### **3.8 Computerprogramme und Datenbanken**

Texte und Tabellen dieser Arbeit wurden mit Microsoft Office XP Professional (Microsoft) auf einem PC erstellt. Zeichnungen, Diagramme und Abbildungen wurden mit den Programmen Adobe Photoshop CS (Adobe) und Adobe Illustrator CS (Adobe) angefertigt. Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm BioEdit 4.8.5 erzeugt (Hall, 1999). Digitale Immunfluoreszenzbilder wurden mit Meta View 4.6 (Universal Imaging Corporation) erstellt. Zur densitometrischen Auswertung der Bandenintensität von DNA in Agarosegelen wurde die Software *Quantity One* des ChemiDoc-Systems (BioRad), für die Quantifizierung von Protein- bzw. RNA-Banden wurde die ImageJ-Software (Abramoff *et al.*, 2004) verwendet. Für die Literatursuche wurde die MEDLINE-Datenbank (National Library of Medicine) unter der Adresse <http://www.ncbi.nlm.gov/PubMed/> benutzt.

## 4 Methoden

---

### 4.1 Bakterien

#### 4.1.1 Kulturbedingungen und Lagerung

##### Flüssigkulturen

Für die Anzucht von *E. coli* in Flüssigkultur wurde steriles LB-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und in Gegenwart entsprechender Antibiotika über Nacht bei 37 °C und 150 – 220 UpM in einem Inkubationsschüttler (New Brunswick) inkubiert. Bei Bedarf wurde die Bakterienkonzentration fotometrisch (SmartSpec™ 3000, BioRad) bei einer Wellenlänge von 600 nm, gegen das Medium bestimmt (1 OD<sub>600</sub> = 8 × 10<sup>8</sup> Zellen/ml). *E. coli*-Kulturen, die ein für E1B-55K kodierendes Plasmid enthielten, wurden bei 30 °C und 150 – 220 Upm inkubiert, um eine Insertion des Transposons *tn10* in den offenen Leserahmen des E1B-Gens zu unterdrücken.

##### Plattenkulturen

Mit einer sterilen Impföse wurden aus einer Flüssig- oder Glyzerinkultur Bakterien entnommen und auf einer Agarplatte so ausgestrichen, dass nach Übernachtinkubation Einzelkolonien isoliert werden konnten. Die so erhaltenen Plattenkulturen sind mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging) verschlossen mehrere Wochen bei 4 °C haltbar.

##### Glyzerinkultur

Die Bakterien einer Einzelkolonie wurden in Flüssigkultur genommen und kurz vor Erreichen der stationären Phase abzentrifugiert (4000 UpM, 10 min; Multifuge 3 S-R, Heraeus). Das entstandene Sediment wurde in 0,5 ml LB-Medium resuspendiert und in *CryoTubes*™ (Nunc) mit 0,5 ml sterilem Glyzerin vermischt. Die so erhaltenen Dauerkulturen sind nahezu unbegrenzt bei -80 °C haltbar.



<b>LB-Medium</b>	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	5 g/l
	• autoklavieren	
<b>Antibiotika-Stammlösungen</b>	Ampicillin (500 x)	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub>
	Kanamycin (200 x)	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub>
	• sterilfiltrieren	
	• bei -20 °C lagern	

## 4.1.2 Transformation von *E. coli*

### 4.1.2.1 Elektroporationsmethode

Die Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach Sharma und Schimke (1996). 1 l YENB-Medium wurde mit 10 ml einer frischen Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,9 bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden 5 min auf Eis gekühlt und anschließend 10 min bei 6000 UpM und 4 °C (Centrikon T-124, Kontron Instruments) abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde daraufhin zweimal mit 100 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> und einmal mit 20 ml 10 %igem Glycerin gewaschen. Es wurde dann in einem Endvolumen von 3 ml 10 %igem Glycerin aufgenommen, in Aliquots von je 50 µl aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

<b>YENB</b>	Bacto Yeast Extract	7,5 g/l
	Bacto Nutrient Broth	8 g/l
	• autoklavieren	

Für die Elektroporation von Ligationsansätzen (4.4.6.2) mussten diese zur Entsalzung zunächst gefällt werden. Hierfür wurden zum Ansatz 5 µg Lachssperma-DNA als *carrier*, 1/10 Vol. 3 M NaOAc und 1 Vol. Isopropanol gegeben. Nach 10 min Zentrifugation mit 14000 UpM (Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) bei RT wurde das Sediment mit EtOH<sub>75 %</sub> gewaschen, getrocknet und in 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> aufgenommen. Die elektrokompenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl der Zellsuspension mit 1 – 10 µl Plasmid-DNA vermischt und in eine vorgekühlte

Elektroporationsküvette (BioRad) mit einem Elektrodenabstand von 1 mm überführt. Die Elektroporation erfolgte in einem *Gene Pulser* (BioRad) nach den Anweisungen des Herstellers bei einer Spannung von 1,25 kV, einer Kapazität von 25  $\mu$ F sowie einem Parallelwiderstand von 200  $\Omega$ . Dabei wurde eine Zeitkonstante von ca. 5 ms erreicht. Nach dem Puls wurden die Zellen sofort mit 1 ml LB-Medium aus den Küvetten gespült, in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt und 1 h bei 37 °C bebrütet. Dann wurden sie abzentrifugiert, in ca. 50  $\mu$ l Überstand resuspendiert und auf LB-Nährböden mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 30 °C bzw. 37 °C bebrütet.

#### 4.1.2.2 Chemische Transformation von *E. coli*

Zur Transformation wurden chemisch-kompetente XL1- und XL2-Blue Zellen zunächst auf Eis aufgetaut und ein Aliquot von 50 – 100  $\mu$ l in vorgekühlte 15 ml Falcon 2059 transferiert, mit 2  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol (1,22 M) und 1 - 10  $\mu$ l Plasmid-DNA vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 s wurden die Bakterien 2 min auf Eis abgekühlt und danach mit 1 ml auf 42 °C vorgewärmten NZCYM- oder SOC- Medium versetzt. Die Bakterien wurden dann 1 h bei 37 °C und 220 UpM im Inkubationsschüttler (New Brunswick) regeneriert, kurz abzentrifugiert und in 50  $\mu$ l LB mit entsprechenden Antibiotika resuspendiert. Anschließend wurden 10 % und 50 % des Ansatzes auf LB-Agarplatten mit geeigneten Antibiotika ausplattiert.

SOC-Medium	Trypton	20 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	MgSO <sub>4</sub>	10 mM
	Glukose	20 mM
	• autoklavieren	

NZCYM	NZ Amin	10 g/l
	NaCl	0,5 g/l
	Hefeextrakt	0,2 g/l
	MgSO <sub>4</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	0,2 g/l
	Casaminosäuren	1 g/l
	• pH 7,5 einstellen	
	• autoklavieren	

## 4.2 Säugerzellen

### 4.2.1 Vermehrung und Aufbewahrung von Zellen

Adhärente Zellen wurden als Einschichtkulturen in liegenden Polystyrolflaschen (Falcon) oder Petrischalen (Falcon) kultiviert. Als Nährmedium diente *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM; Gibco BRL; Dulbecco und Freeman, 1959) mit 0,11 g/l Natriumpyruvat. Das Medium wurde mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS; Pan) angereichert und mit 1 % einer Penicillin/Streptomycin-Lösung (1000 U/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin in 0,9 % NaCl; Pan) versetzt. Zur Inhibition von Komplementfaktoren im fötalen Kälberserum wurde dieses vor Gebrauch bei 56 °C 30 min inaktiviert. Die Zellen wurden bei 37 °C in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (Heraeus) mit 5 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert und regelmäßig mit frischem Medium versorgt. Alle 3 - 5 Tage (abhängig von der Zelldichte) wurden die Zellen im Verhältnis 1:4 bis 1:10 subkultiviert.

Dazu wurde das Medium abgesaugt, die adhärenen Zellen wurden mit sterilem PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (Pan) von den Zellkulturgefäßen abgelöst. Nach Kompetition der Proteaseaktivität des Trypsins durch Zugabe von 1 Vol. angereichertem Medium wurden die abgelösten Zellen in einem Polystyrol-Röhrchen (Greiner) abzentrifugiert (2000 UpM, 3 min; Rotixa 50RS, Hettich). Der Überstand wurde anschließend abgesaugt und das Zellpellet in einem kleinen Volumen angereichertem DMEM resuspendiert. Danach wurden die Zellen in einem geeigneten Verhältnis auf neue Kulturgefäße verteilt, die bereits vorgewärmtes Medium mit 10 % FKS enthielten.

PBS (pH 7,0 - 7,7)	NaCl	140 mM
	KCl	3 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
	⇒ autoklavieren	

#### 4.2.2 Lagerung von Säugerzellen

Für die dauerhafte Lagerung von Säugerzellen wurden subkonfluente Zellen nach vorheriger Ablösung durch Trypsin/EDTA (4.2.1) 3 min bei 2000 UpM und 4 °C (Hettich Rotixa 50RS,) zentrifugiert und das Zellsediment in 1 ml FKS (Pan) mit 10 % DMSO (Sigma) aufgenommen und in *CryoTubes*<sup>TM</sup> (Nunc) überführt. Die Kühlung der Zellen erfolgte mit Hilfe des Cryo-Einfriergeräts „Mr. Frosty“ (Zefa Laborservice) nach Angaben des Herstellers. Zur Rekultivierung wurden die tiefgefrorenen Zellen rasch bei 37 °C erwärmt und die Zellsuspension in einer geeigneten Kulturflasche (Falcon) mit vorgewärmtem Medium bei 37 °C inkubiert. Um vorhandenes DMSO zu entfernen, wurde, nachdem sich die Zellen auf dem Flaschenboden abgesetzt hatten (nach 4 bis 5 h), das vorhandene Medium durch Frisches ersetzt und die Zellen wie unter 4.2.1 beschrieben weiterkultiviert.

#### 4.2.3 Bestimmung der Gesamt-Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurden die Zellen trypsiniert (4.2.1) und je nach Zelldichte verdünnt. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurde ein 50 µl Aliquot der Zellsuspension mit 1 Vol. Trypanblau-Lösung versetzt, wobei der Farbstoff nur in abgestorbene Zellen eindringen kann. Nachdem die mit Trypanblau versehene Zellsuspension in die Zählkammer überführt worden war, wurden die Zellen aus 16 Kleinquadraten des kammereigenen Rasters im Lichtmikroskop (Leica DM IL) ausgezählt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung ergibt sich nach Multiplikation der Zellzahl mit dem Faktor 10<sup>4</sup> die Anzahl der Zellen pro ml Gesamtkultur.

<b>Trypanblau-Lösung</b>	Trypanblau	0,15 %
	NaCl	0,85 %

## 4.2.4 Transfektion von Säugerzellen

### 4.2.4.1 Kalziumphosphat-Methode

Adhärente Säugerzellen wurden nach der Kalziumphosphat-Methode (Graham und van der Eb, 1973) in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (*6-well* Schale; Falcon) oder Zellkulturpetrischalen mit einem Durchmesser von 100 mm (Falcon) transfiziert. Die Methode beruht auf der Ausbildung von Kalziumphosphat-Kristallen, welche die zu transfizierende DNA einschließen, an der Zelloberfläche adsorbieren und endozytiert werden.

Die Zellen wurden ausgesät und 12 – 24 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Dichte von 40 – 60 % hatten. Eine Stunde vor Transfektionsbeginn wurde das Medium gewechselt. Für die Transfektion einer Petrischale wurden 30 µg Gesamt-DNA in 500 µl Gesamtvolumen aus sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> und 250 mM CaCl<sub>2</sub> aufgenommen und in Polystyren-Reaktionsröhrchen (Falcon) unter leichtem Mischen (Vortex, 1000 UpM) langsam zu je 500 µl 2 x BBS zugetropft. Für die Transfektion einer Zellkulturschale mit sechs Vertiefungen (*6-well* Schale; Falcon) wurden 10 µg Gesamt-DNA in 300 µl Gesamtvolumen aus sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> und 250 mM CaCl<sub>2</sub> aufgenommen und in Polystyrol-Reaktionsröhrchen (Falcon) unter leichtem Mischen (Vortex, 1000 UpM) langsam zu je 300 µl 2 x BBS zugetropft. Nachdem die Röhrchen für die Ausbildung des Präzipitats 15 min bei RT inkubiert worden waren, wurde der Inhalt auf die Zellen getropft und kurz geschwenkt. Nach ca. 16 h im Brutschrank wurde das Medium gewechselt und die transfizierten Zellen je nach Versuchsansatz entsprechend weiterkultiviert.

<b>2 x BBS</b> ( <i>BES buffered saline</i> )	BES	50 mM
	NaCl	280 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 mM
	• pH 7,02 exakt einstellen	
	• sterilfiltrieren	

2,5 M CaCl<sub>2</sub>

CaCl<sub>2</sub>  
• sterilfiltrieren

2,5 M

#### 4.2.4.2 Liposomen-Methode

Um möglichst gleichmäßige und reproduzierbare DNA-Mengen in eukaryotische Zellen zu transfizieren wurde das Lipofectamin-Transfektionssystem von Invitrogen benutzt. Das Prinzip dieser Methode beruht dabei auf der spontanen Anlagerung von positiv geladenen kationischen Lipiden zu Liposomen oder kleinen Vesikeln, welche die negativ geladene DNA umschließen. Diese Lipid-DNA-Komplexe fusionieren anschließend mit der Zellmembran und ermöglichen somit den Transport der DNA in die Zellen. 24 h vor der Transfektion wurden  $2 \times 10^6$  adhärente Zellen in 100 mm-Zellkulturschalen (Falcon) ausgesät und mit 8 ml Medium (DMEM, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin) kultiviert. Die Zellen waren am nächsten Tag zu 60 - 80% konfluent und wurden nach Angaben des Herstellers transfiziert. Nach 24 - 48h wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen (4.6.6.1) und für SDS-PAGE (4.6.3) verwendet.

#### 4.2.5 Ernte von Säugerzellen

Für die Zellernte wurden die Zellen im Medium mit Hilfe eines Plastikschabers (Sarstedt) vom Boden der Zellkulturschale (Falcon) abgeschabt, in ein geeignetes Reaktionsgefäß (Greiner) überführt und bei Raumtemperatur 3 min bei 2000 UpM (Multifuge 3 S-R, Heraeus) zentrifugiert. Es folgte ein Waschschrift mit 5 ml PBS und anschließender Zentrifugation (2000 UpM, 3 min; Multifuge 3 S-R, Heraeus). Das erhaltene Zellsediment wurde entweder bei -80 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

---

---

## 4.3 Adenoviren

### 4.3.1 Gewinnung von Virus aus DNA

Adenovirale DNA-Bacmide wurden mit der Restriktionsendonuklease *PacI* vom bakteriellen Anteil befreit (vgl. 4.4.6.1). Diese linearisierte DNA wurde mit  $1/10$  Vol. 3 M NaOAc und 1 Vol. Isopropanol gefällt und je 30  $\mu$ g gespaltene Bacmid-DNA pro 100 mm-Petrischale (Falcon) in 911-Zellen nach der Kalziumphosphat-Methode (4.2.4.1) transfiziert. Nach ca. 16 h im Brutschrank wurde das Medium gewechselt. Die transfizierten Zellen wurden solange weiterkultiviert bis sich die Zellen von der Unterlage ablösten (jedoch max. 5 Tage). Hatten sie sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht vom Boden der Petrischale gelöst, wurden die Zellen mit einem Zellschaber (Sarstedt) abgeschabt, bei 2000 UpM für 5 min pelletiert (Multifuge 3 S-R, Heraeus), mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend in 5 ml DMEM durch viermaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C im Wasserbad lysiert und abermals zentrifugiert (4500 Upm bei RT für 10 min; Multifuge 3 S-R, Heraeus). Mit dem erhaltenen Überstand wurde erneut eine Petrischale reinfiziert (4.3.4). Dieser Vorgang wurde solange wiederholt (in der Regel zwei- bis fünfmal) bis sich die infizierten Zellen alleine vom Boden ablösten. Die Zellen wurden dann wie oben beschrieben geerntet, gewaschen und lysiert. Mit dem erhaltenen Überstand wurde nun eine 150 mm-Zellkulturschale infiziert. Da im Überstand schon eine beträchtliche Menge an Adenoviren enthalten war, fielen die Zellen bald nach der Infektion ab und der Überstand konnte nach der Ernte und Lyse für die Herstellung hochtitriger Virusstocks (4.3.2) benutzt werden.

### 4.3.2 Herstellung und Lagerung hochtitriger Virusstocks

Für die Gewinnung hochtitriger Virusstocks wurden mehrere 150 mm-Zellkulturschalen entweder mit einer *moi* von 5 (wenn bekannt) oder mit dem Überstand aus 4.3.1 infiziert. Ca. drei Tage nach Infektion war ein deutlicher zytopathischer Effekt sichtbar, das Medium verfärbte sich gelblich und die Zellen

lösten sich von der Unterlage. Da 90 % der produzierten Viren zellassoziiert bleiben (Jakoby und Pastan, 1979) wurden die Zellen von der Unterlage abgeklopft und 5 min bei 2000 Upm zentrifugiert (Multifuge 3 S-R, Heraeus). Das Pellet wurde in 5 ml PBS gewaschen und anschließend erneut zentrifugiert (2000 UpM, 5 min; Multifuge 3 S-R, Heraeus). Das Zellpellet, das man aus sieben 175-cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflaschen erhalten hatte, wurde in 5 ml DMEM ohne FKS resuspendiert und die Zellen durch viermaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C lysiert. Zur Entfernung der Zelltrümmer wurde 10 min bei 4500 UpM zentrifugiert (Multifuge 3 S-R, Heraeus). Anschließend wurde der Überstand abgenommen, mit 87 %igem Glycerin (steril; 10 % Endkonzentration) versetzt und austitriert (4.3.3). Diese Stocks sind bei -80 °C konservierbar.

### 4.3.3 Titerbestimmung von Virusstocks

Der Titer der verwendeten Virusstocks wurde mit Hilfe von fluoreszenzbildenden Einheiten (*fluorescence forming unit*, ffu) bestimmt. Im Gegensatz zum *Plaque Assay* (Jakoby und Pastan, 1979) bei dem die Fähigkeit der Viren zu infizieren und anschließend die Zellen zu lysieren und *Plaques* zu bilden gemessen wird, konzentriert sich die Bestimmung der ffu nur auf die frühen Infektionsereignisse, repräsentiert durch die immunhistochemische Bestimmung des frühen adenoviralen E2A-72K Proteins.

Dazu wurden je 3 x 10<sup>5</sup> 911-Zellen in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (*6-well* Schale; Falcon) ausgesät (4.2.3). 12 bis 24 h später wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Virusstockverdünnungen (10<sup>-3</sup> bis 10<sup>-6</sup> in Infektionsmedium) infiziert (4.3.4). Die Zellen wurden dann 1 - 2 h bei 37 °C im Brutschrank (Heraeus) inkubiert und währenddessen alle 15 min vorsichtig geschwenkt, um eine gleichmäßige Virusadsorption zu gewährleisten. Anschließend wurde das Infektionsmedium abgenommen, die Zellen mit 3 ml/Vertiefung angereichertem Medium überschichtet und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. 24 h p.i. wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml/Vertiefung eiskaltem Methanol für 15 min bei -20 °C fixiert (4.6.6.2). Dann



wurde der Alkohol abgesaugt und die Zellkulturschalen bei RT getrocknet. Für die anschließende immunhistochemische Färbung wurden die Zellen 2 x je 15 min mit 2 ml/Vertiefung TBS-BG gewaschen, 3 h bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C mit einer 1:10 Verdünnung des Antikörpers B6-8 in TBS-BG (1 ml/Vertiefung) inkubiert, erneut 3 x mit TBS-BG (2 ml/Vertiefung) für je 5 min gewaschen und anschließend mit je 1 ml/Vertiefung der zweiten Antikörperverdünnung (Alexa™ 488 Anti-Maus; 1:1000 in TBS-BG) für 3 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde der Sekundärantikörper abgenommen, abermals 3 x mit TBS-BG gewaschen und mit 1 ml TBS-BG versetzt. Die so vorbereiteten Zellen konnten bis zu 48 h ohne Signalverlust im Dunkeln bei 4 °C gelagert und anschließend mit dem Immunfluoreszenzmikroskop (Zeiss) ausgezählt werden. Aus der pro Gesichtsfeld ermittelten Zahl infizierter Zellen, konnte unter Berücksichtigung der Zellzahl und der Verdünnungsstufe auf die Zahl der infektiösen Partikel pro ml zurückgerechnet werden.

<b>Infektionsmedium</b>	CaCl <sub>2</sub>	2 mM
	MgCl <sub>2</sub>	2 mM
	FKS	0,2 %
	Pen/Strep	1 %
	• in PBS	
<b>TBS-BG</b>	Tris/HCl, pH 7,6	20 mM
	NaCl	137 mM
	HCl	3 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
	Tween 20	0,05 %
	Natriumazid	0,05 %
	Glycin	5 mg/ml
	BSA	5 mg/ml

#### 4.3.4 Infektion mit Adenoviren

Für die Infektion wurden Zellen so ausgesät, dass sie am nächsten Tag subkonfluent (60 – 80 %) herangewachsen waren. Die Zellen wurden nach Absaugen des Mediums mit sterilem PBS gewaschen. Für die Infektion wurde die entsprechende Menge an

Virus (moi zwischen 1 und 50) mit dem geeigneten Volumen Medium (DMEM) ohne FKS und Penicillin/Streptomycin vermischt und auf die Zellen gegeben. Für die Infektion einer Zellkulturschale mit sechs Vertiefungen benötigte man ein Gesamtvolumen von 1 ml, für Petrischalen wurden 4 ml und für die Infektion einer 150 mm großen Zellkulturschale wurden 9 ml Gesamtvolumen benötigt. Die Zellen wurden dann für 1 - 2 h bei 37 °C inkubiert und alle 15 min leicht geschwenkt, um eine gleichmäßige Adsorption der Viren zu ermöglichen. Anschließend wurde die Infektionslösung abgenommen und die Zellen mit frischem Medium (DMEM) mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin überschichtet. Die infizierten Zellen wurden je nach Versuchsansatz entsprechend weiter inkubiert.

### **4.3.5 Bestimmung der Ausbeute an Virusnachkommen**

Um die Anzahl der Nachkommenviren zu bestimmen, wurden Zellen (HeLa bzw. A549) in Petrischalen (Falcon) wie unter 4.3.4 beschrieben mit Adenoviren infiziert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. Dazu wurden die Zellen mit Hilfe eines Plastikspatels (Sarstedt) vom Boden der Petrischale (Falcon) abgeschabt, in ein 15 ml Reaktionsgefäß (Falcon) überführt und bei 4 °C 5 min bei 2000 UpM (Multifuge 3 S-R, Heraeus) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 5 ml sterilem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (4 °C, 5 min, 2000 UpM; Multifuge 3 S-R, Heraeus). Nun konnte das Pellet in 500 µl Medium (DMEM) ohne FKS und Penicillin/Streptomycin resuspendiert und die Zellen durch viermaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C lysiert werden. Zur Entfernung der Zelltrümmer wurde 10 min bei 4500 UpM zentrifugiert (Multifuge 3 S-R, Heraeus). Der virushaltige Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und konnte bei 4 °C gelagert werden. Die Zahl der infektiösen Partikel im Überstand konnte wie unter 4.3.3 angegeben bestimmt werden. Aus dieser Zahl, der Verdünnung und der Anzahl der in dem Versuch eingesetzten Zellen konnte die Zahl der Nachkommenviren berechnet werden.

## 4.4 DNA-Techniken

### 4.4.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur analytischen Isolierung kleiner Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde ein von Beck und Mitarbeiter modifiziertes Verfahren der alkalischen Lyse eingesetzt (Beck *et al.*, 1993). Dabei wurde eine 1,5 ml Übernachtskultur bei RT für 1 min bei 13 000 UpM (Eppendorf Tischzentrifuge 5417, Eppendorf) abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 300 µl Puffer A resuspendiert. Die Suspension wurde dann mit 300 µl Puffer B versetzt, vorsichtig geschwenkt, 5 min bei RT inkubiert, 300 µl Puffer C zugegeben, erneut 5 min bei RT inkubiert und anschließend ebenfalls bei RT für 10 min bei 13 000 UpM (Eppendorf Tischzentrifuge 5417, Eppendorf) zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt und die DNA 20 min bei 13 000 UpM (Eppendorf Tischzentrifuge 5417, Eppendorf) gefällt. Der Überstand wurde abgesaugt und das DNA-Präzipitat mit 1 ml EtOH<sub>75%</sub> gewaschen, getrocknet und in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> gelöst. Die so isolierte DNA konnte für Restriktions- und Sequenzanalysen eingesetzt werden.

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

Die präparative Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA aus 100 – 500 ml Übernachtskultur erfolgte mit Hilfe von Anionenaustauscher-Säulen des Plasmid Midi und Plasmid Maxi Extraktions Kits (Qiagen) nach Anweisungen des Herstellers.

#### 4.4.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde mit Hilfe eines Spektralfotometers (Lambda 25, PerkinElmer) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die zu analysierende DNA-Lösung wurde in eine Quarzküvette (1 cm Schichtdicke) gegeben und ein UV-Absorptionsspektrum über den Wellenlängenbereich von 230 bis 300 nm aufgenommen. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Absorption von 1,0 im Absorptionsmaximum bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml. Für einzelsträngige Oligonukleotide gilt die Näherungsformel  $1 \text{ OD}_{260} = 33 \text{ µg/ml}$ .

#### 4.4.3 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Untersuchung von DNA-Proben durch gelelektrophoretische Auftrennung in Agarosegelen beruht auf der unterschiedlichen Wandergeschwindigkeit der DNA im elektrischen Feld in Abhängigkeit von der Fragmentlänge.

Zur Herstellung von Agarosegelen wurde eine entsprechende Menge Agarose (*Seakem*<sup>®</sup> *LE agarose*, FMC Bioproducts) in einem Mikrowellenherd (Moulinex) in 1 x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und zur späteren Färbung der DNA 50 ng/ml Ethidiumbromid-Stammlösung hinzugefügt. Die leicht abgekühlte Agarose-Gellösung wurde dann in eine vorbereitete Flachbettgelapparatur gegossen. Die DNA-Proben wurden mit jeweils  $1/10$  Vol. Auftragspuffer versetzt und auf das verfestigte Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 5 - 10 V/cm. Analytische Gele wurden mit Hilfe des ChemiDoc (BioRad) bei einer Wellenlänge von 312 nm visualisiert und dokumentiert. Präparative Gele wurden zur Schonung der DNA bei langwelligem UV-Licht (365 nm) detektiert, und entsprechende DNA-Banden ausgeschnitten. Um die DNA-Schäden durch UV-Licht weiter zu minimieren, insbesondere bei großen DNA-Fragmenten wie z. B. bei Ad-Bacmiden, wurde bei präparativen Gelen zusätzlich 1 mM Guanosin in die Gellösung eingebracht.

<b>5 x TBE</b>	Tris	0,45 M
	Borsäure	0,45 M
	EDTA	10 mM
	• mit Eisessig pH 7,8	
<b>Auftragspuffer</b>	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Xylencyanol	0,25 % (w/v)
	Glyzerin	50 % (v/v)
	50 x TAE	2 % (v/v)
<b>Ethidiumbromid-Stammlösung</b>	Ethidiumbromid	10 mg/ml
	• Lagerung bei 4 °C, lichtgeschützt	

#### 4.4.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte entweder mit Hilfe des *Qiagen Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers oder über ein alternatives Verfahren, das insbesondere für die Isolierung von Bacmid-DNA-Fragmenten herangezogen wurde. Dabei wurde ein Agaroseblock mit der zu präparierenden DNA-Bande zunächst unter langwelligem UV-Licht (365 nm) aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend für 2 h bei RT und 20000 UpM im SS34-Rotor (Centrikon T-24, Kontron Instruments) zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde dann mit  $1/10$  Vol. 3 M NaOAc und 1 Vol. Isopropanol gefällt, das DNA-Pellet in 40  $\mu$ l 10 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgenommen und die Konzentration und Qualität der isolierten DNA über erneute Agarose-Gelelektrophorese (4.4.3) eines Aliquots abgeschätzt.

#### 4.4.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

##### 4.4.5.1 Standard-PCR-Ansatz

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR; Saiki *et al.*, 1988) ist ein Verfahren zur überexponentiellen Vermehrung (Amplifikation) definierter Nukleinsäuresequenzen *in vitro*, wobei die Spezifität der Reaktion durch die Wahl der

zugesetzten Starter-Oligonukleotide sichergestellt wird.

Für einen 50 µl Standard-Reaktionsansatz wurden 0,01 – 1 µg DNA, je 0,2 µM der entsprechenden Oligonukleotide, je 1 µl dATP, dTTP, dCTP und dGTP (entspricht je 1 mM), 5 µl 10 x PCR-Puffer und 0,5 µl thermostabile *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl; Roche) eingesetzt. Dieser Ansatz wurde in dünnwandigen 0,2 ml Reaktionsgefäßen (Biozym) in einem Thermocycler (*GeneAmp<sup>TM</sup> PCR System 9700*, Perkin Elmer) nacheinander wie folgt inkubiert:

0,5 - 1 min	95 °C	Aufschmelzen der DNA
0,5 - 1 min	55 – 70 °C	Hybridisieren der Oligonukleotide an die Zielsequenz
1 min pro kb	72 °C	Polymerisation

Dieser Zyklus wurde 20- bis 30-mal durchlaufen, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation bei 72 °C um 3`-Enden nicht vollendeter PCR-Produkte aufzufüllen, und im Anschluss daran auf 4 °C abgekühlt. 5 µl der so amplifizierten DNA wurden auf einem Agarosegel elektrophoretisch (4.4.3) aufgetrennt und unter UV-Licht hinsichtlich Fragmentgröße und Ausbeute überprüft.

#### 4.4.5.2 Einführen von Mutationen durch PCR

Die In-vitro-Punktmutagenese rekombinanter Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *QuikChange<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) nach den Anweisungen des Herstellers. Dazu wurde ausgehend von zwei komplementären Oligonukleotiden, welche die gewünschten Mutationen enthielten, das gesamte Plasmid amplifiziert. Die Zyklenabfolge war dabei wie folgt:

0,5 min	95 °C	Aufschmelzen der DNA
1 min	55 °C	Hybridisieren der Oligonukleotide an die Zielsequenz
2 min pro kb	68 °C	Polymerisation

#### 4.4.5.3 PCR zum Nachweis der Virusreplikation

Aus dem Gesamtzellextrakt (4.6.1.1) infizierter Zellen wurden gleiche Mengen an Zelllysat (entsprechend der Proteinkonzentration) entnommen, mit Tween-20

(Endkonzentration 0,5 %) und Proteinase K (Endkonzentration 100 µg/ml) versetzt und mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf 24,5 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde nun eine Stunde im Heizblock (Eppendorf Thermomixer comfort) bei 55 °C inkubiert. Nach 10 min Inaktivierung der Proteinase K bei 100 °C wurde eine Standard-PCR (Denaturierung: 30 s bei 95 °C, Hybridisierung: 1 min bei 55 °C und Polymerisation: 2 min bei 72 °C) mit 20 Zyklen durchgeführt. Als Primer dienten die zwei Oligonukleotide E1B bp2043 fwd (#64) und E1B 361-389 rev (#110), die ein 389 bp langes Fragment aus dem Ad5 E1B-55K-Gen amplifizieren. Die PCR-Produkte wurden in einem 1 %igen Agarosegel analysiert (4.4.3) und mit Hilfe der Software *Quantity One* des ChemiDoc (BioRad) densitometrisch ausgewertet.

### 4.4.6 Klonierung von DNA-Fragmenten

#### 4.4.6.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme

Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen New England Biolabs und Roche bezogen und zusammen mit den dazu gehörigen 10 x Puffern gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt. Um Pufferunverträglichkeiten bei Spaltungen mit mehreren Enzymen zu umgehen, wurde die DNA gegebenenfalls nach jedem einzelnen Verdau mit 1/10 Vol. 3 m NaOAc und 1 Vol. Isopropanol gefällt und erneut in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> aufgenommen. Für analytische Spaltungen wurden in der Regel 0,5 - 1 µg DNA sowie je 3 - 10 U Restriktionsenzym eingesetzt und, falls nicht anders angegeben, 1 h bei 37 °C inkubiert. Präparative Restriktionsspaltungen enthielten 5 - 20 µg DNA und je 50 U Enzym, bei einer Inkubation bei 37 °C für mindestens 2 h. Bei der Klonierung adenoviraler Bacmid-DNA wurde je 1 µg DNA mit 25 U Restriktionsenzym gespalten (*SwaI* bei 30 °C für 20 h; *BstZ17I* bei 37 °C für 4 h). Zu spaltende PCR-Produkte wurden nach der PCR-Reaktion zunächst über NaOAc/Isopropanolfällung von nicht-inkorporierten Oligonukleotiden und dNTPs gereinigt und konzentriert, bevor sie über Restriktionsenzymspaltung für die Klonierung vorbereitet werden konnten. Nach der Spaltung wurden die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt (4.4.3) und gegebenenfalls aus dem Gel gereinigt (4.4.4).

### 4.4.6.2 Ligation und Transformation

Mit Restriktionsenzymen linearisierte Vektor-DNA wurde direkt im Anschluss an deren Spaltung mit 5 U thermosensitiver alkalischer Phosphatase (tsAP, *thermosensitive alkaline phosphatase*, Roche) für 30 min bei 37 °C und anschließend für 45 min bei 65 °C dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu verhindern. DNA-Fragmente wurden vor der Ligation jeweils wie unter 4.4.4 beschrieben aufgereinigt und deren Konzentration abgeschätzt. Ein Standard-Ligationsansatz enthielt 20 - 100 ng Vektor-DNA sowie die drei- bis fünffache molare Menge an zu klonierender Fremd-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 2 µl 10 x Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase (Roche). Für die kovalente Verknüpfung der Phosphodiesterbrücken wurde der Ansatz über Nacht bei 13 °C inkubiert und anschließend zur Transformation in *E. coli* (4.1.2) eingesetzt.

### 4.4.6.3 Identifizierung rekombinanter Klone

Ausgehend von den transformierten *E. coli*, die auf LB-Agarplatten mit geeigneten Antibiotika wuchsen, wurden Einzelkolonien mit einem sterilen Zahnstocher in LB-Flüssigmedium mit geeigneten Antibiotika überimpft und über Nacht bei 37 °C mit 220 UpM inkubiert. Plasmid-DNA wurde durch alkalische Lyse (4.4.1) präpariert und in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> aufgenommen. Je 5 µl davon wurden durch Spaltung mit geeigneten Restriktionsenzymen (4.4.6.1) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese (4.4.3) analysiert. Die so identifizierten rekombinanten Klone wurden durch DNA-Sequenzierung (4.4.6.4) überprüft und als Glyzerinkultur (4.1.1) aufbewahrt.

### 4.4.6.4 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden 500 ng Plasmid-DNA und 6 pmol eines entsprechenden Oligonukleotids mit H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> auf ein Endvolumen von 8 µl aufgefüllt. Die DNA-Sequenzierungen dieser Arbeit wurden von der Firma GeneArt durchgeführt.



---

---

## 4.5 RNA-Techniken

### 4.5.1 Vermeidung RNase-induzierten RNA-Abbaus

Ribonukleasen (RNasen) sind sehr stabile und aktive Enzyme, die selbst in geringen Konzentrationen und in kürzester Zeit RNA abbauen können. Um den Abbau der RNA zu vermeiden, wurden beim Arbeiten mit RNA spezielle Vorkehrungen getroffen. Gegenstände aus Glas und Metall wurden in einem Ofen für 12 h bei 160 °C gebacken, ein Vorgang der RNasen irreversibel denaturiert. Alle Chemikalien wurden in H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> gelöst und mit DEPC auf eine Endkonzentration von 0,1 % (v/v) zugegeben, soweit das DEPC nicht mit den entsprechenden Reagenzien interferiert. Die DEPC-haltigen Lösungen wurden über Nacht bei RT inkubiert und am nächsten Tag autoklaviert. Dabei reagiert das DEPC mit den Aminogruppen der RNasen und inaktiviert diese irreversibel. Durch das Erhitzen während des Autoklavierens zersetzt sich überschüssiges DEPC und stört nicht mehr in nachfolgenden Prozessen.

### 4.5.2 Präparation von RNA aus Säugerzellen

Für die Isolierung von zytolpasmatischer und nukleärer RNA mussten die Säugerzellen zunächst fraktioniert werden. Dazu eignen sich nur frisch geerntete Zellen, da sich durch das Einfrieren Eiskristalle bilden, die die zelluläre Membran und die Kernmembran schädigen, und somit eine Durchmischung der Kompartimente stattfindet. Das Zellpellet aus der Zellernte (4.2.5) wurde in 175 µl auf 4 °C vorgekühltem RLN-Puffer resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei 4 °C für 2 min bei 950 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt. Diese Fraktion wurde als Zytoplasma-Fraktion bezeichnet. Das Pellet stellte die Zellkern-Fraktion dar. Die weitere Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des *RNeasy*<sup>®</sup> Mini-Systems (Qiagen) nach Anweisung des Herstellers. Die gereinigte RNA wurde anschließend im Fotospektrometer vermessen (4.5.3) und die Integrität der RNA auf einem Agarosegel überprüft (4.5.5).

<b>RLN-Puffer</b>	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	140 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
	Nonidet P-40	0,5 % (v/v)
	• in H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	
	• Lagerung bei 4 °C	

### 4.5.3 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration von RNA wurde fotometrisch (Lambda 25, PerkinElmer) in einer Quarzküvette (1 cm Schichtdicke, Hellma) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine Absorption von 1,0 bei 260 nm einer Konzentration von 40 µg/ml.

### 4.5.4 Herstellung Digoxigenin-gekoppelter cRNA-Sonden

Das gewünschte PCR-Fragment (Fiber und L4-100K) wurde jeweils mit Hilfe des TOPO TA Cloning® Kits (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers in einen pCR®II-TOPO®-Vektor (Invitrogen) kloniert. Damit wurden anschließend chemisch kompetente TOP10 *E. coli* (Invitrogen) ebenfalls nach Anweisung des Herstellers transformiert. Nach der Isolierung der Plasmide (4.4.1) konnte die DNA mit Hilfe des DIG RNA Labeling Kits (Roche) zur Herstellung Digoxigenin-markierter Sonden eingesetzt werden. Je nach Klonierung des DNA-Fragments wird *sense*- bzw. *antisense*-cRNA transkribiert. Vor der Transkription wurde der Vektor linearisiert, damit „run off“-Transkripte entstehen. „round circle“-Transkripte, die entstehen, wenn der Vektor nicht linearisiert vorliegt, enthalten neben der Sequenz des DNA-Fragments auch die Vektorsequenz. Die Linearisierung wurde mit einem Enzym, das einen 5'-Überhang erzeugt und dem gewünschtem Promotor gegenüberliegt, durchgeführt. Zur Herstellung der *antisense*-cRNA wurde die T7-Polymerase nach Angaben des Herstellers bei der In-vitro-Transkription verwendet. Die Digoxigenin-markierte RNA konnte bei -20 °C gelagert werden.

#### 4.5.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

Die gelelektrophoretische Auftrennung von RNA-Proben (1 – 2 µg) wurde in 1 %igen Formaldehyd-Agarose (FA)-Gelen nach Fournery (Fournery *et al.*, 1989) erreicht. Die Agarose (*Seakem*<sup>®</sup> *LE agarose*, FMC Bioproducts) wurde in 1 x MOPS-Puffer im Mikrowellenherd (Moulinex) aufgekocht und nach Abkühlung auf 60 °C mit Formaldehyd zu einer Endkonzentration 2 % und gegebenenfalls mit 50 ng/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Formaldehyd-Agaroselösung wurde anschließend unter einem Abzug in eine vorbereitete Flachbettgelapparatur gegossen. Vor Gebrauch wurde das Gel für mindestens 30 min in 1 x MOPS-Puffer äquilibriert. Die RNA-Proben wurden mit 1/5 Vol. RNA-Auftragspuffer versetzt, 5 min bei 65 °C denaturiert, auf Eis gekühlt und auf das FA-Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte im elektrischen Feld mit 3 – 5 V pro cm Elektrodenabstand. Im Anschluss an die FA-Gelelektrophorese konnte die aufgetrennte RNA entweder mit Hilfe des ChemiDoc (BioRad) bei einer Wellenlänge von 312 nm visualisiert und dokumentiert werden oder über *Northern Blot*-Analysen (4.5.6) detektiert werden.

<b>10 x MOPS-Puffer</b>	MOPS	200 mM
	NaOAc	50 mM
	EDTA	10 mM
	• in H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	
	• pH 7,0 mit NaOH	
<b>1 x MOPS-Puffer</b>	10 x MOPS-Puffer	100 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	900 ml
<b>5 x RNA-Auftragspuffer</b>	Bromphenolblau (gesättigte Lösung)	16 µl
	EDTA, 500 mM, pH 8,0	80 µl
	Formamid	3084 µl
	Formaldehyd, 37 %	720 µl
	Glyzerin, 100 %	2 ml
	10 x MOPS-Puffer	4 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	2 ml
	• Lagerung bei -20 °C (3 Monate stabil)	

#### 4.5.6 *Northern Blot*

##### Transfer der RNA auf eine Nylonmembran

Das Übertragen der RNA aus dem FA-Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche) mittels Kapillarkräften erfolgte nach dem *Northern Blot*-Verfahren. Dazu wurde das FA-Gel zunächst 3 x 15 min in H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> gewaschen, um das Formaldehyd zu entfernen. Anschließend wurde das Agarosegel 45 min in 20 x SSC äquilibriert. Der Transfer wurde mit Hilfe eines TURBOBLOTTER™ (Schleicher & Schuell) nach Anleitung des Herstellers in 20 x SSC-Puffer für 6 h durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran für 5 min mit 2 x SSC gewaschen und zur Immobilisierung der RNA auf der Membran mit UV-Licht bestrahlt (0,45 J/cm<sup>2</sup>; UV-Stratalinker, Stratagene). Zur Kontrolle des Transfers wurde die Membran mit 0,03 % Methylblau in 0,3 M Natriumacetat gefärbt und die RNA-Markerbanden, sowie die ribosomale 18S- und 28S-RNA mit einem weichen Bleistift markiert. Anschließend wurde die Membran mit H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> entfärbt.

##### Hybridisierung Membran-gebundener RNA

Als Hybridisierung bezeichnet man die Assoziierung zweier einzelsträngiger Nukleinsäuremoleküle unter Ausbildung partieller oder vollständiger Doppelstränge. Zur Vorhybridisierung wurde die entfärbte Membran in eine Hybridisierungsflasche (Biometra) überführt. Je nach Größe der Membran wurde eine geeignete Menge DIG Easy Hyb (Roche) zugegeben und für 30 min bei 68 °C in einem Rollinkubator (Binder) vorhybridisiert, um alle unspezifischen Bindestellen abzudecken.

Für die Hybridisierung wurde die Digoxigenin-markierte cRNA-Sonde (100 ng/ml) mit 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Die Sonde konnte nun in einem geeigneten Volumen Hybridisierungspuffer (DIG Easy Hyb; Roche) zu der Membran gegeben und über Nacht bei 68 °C in einem Rollinkubator (Binder) inkubiert werden. Am nächsten Tag wurde die Membran 2 x 10 min bei RT mit dem hoch-stringenten Waschpuffer 1 und anschließend mit dem niedrig-stringenten Waschpuffer 2 bei 68 °C 3 x 15 min gewaschen.

Detektion über Enzym-Substrat vermittelte Farbreaktion

Der Nachweis hybridisierter, Digoxigenin-markierter cRNA-Sonden erfolgte mit Hilfe Alkalischer Phosphatase-konjugierter anti-Digoxigenin-Antikörper (Roche). Die Membran wurde dazu für 5 min in Maleinsäurepuffer mit 0,3 % Tween 20 äquilibriert und anschließend bei RT für 30 min in 1 % *Blocking*-Lösung (Roche) in Maleinsäurepuffer inkubiert. Die Bindung des anti-Digoxigenin-Antikörpers (1:10000 in *Blocking*-Lösung) erfolgte für 30 min bei RT. Nach 2 x 15 min Waschen in Maleinsäurepuffer mit 0,3 % Tween 20, wurde die Membran 5 min in Detektionspuffer äquilibriert, bevor sie für weitere 5 min in dem lumineszierenden Phosphatase-Substrat CSPD (1:100 in Detektionspuffer; Roche) inkubiert wurde. Nach Abtropfen der überschüssigen Flüssigkeit wurde die Membran in eine Hybridisierungstasche (Roche) eingeschweißt, zur Verstärkung der Lumineszenz für 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend in einer Autoradiografiekassette mit einem Röntgenfilm (CL-XPosure™ Film; Pierce) bedeckt. Nach geeigneten Expositionszeiten wurde der Film mit Hilfe von Entwicklungs- (*GBX Developer*, Kodak) und Fixierlösung (*GBX Fixer*, Kodak) nach Angaben des Herstellers entwickelt.

<b>20 x SSC</b>	NaCl Natriumcitrat • pH 7,2 mit NaOH • mit DEPC behandeln, autoklavieren	3 M 0,3 M
<b>Waschpuffer 1</b> (hoch-stringent)	20 x SSC 10 % SDS H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	50 ml 5 ml ad 500 ml
<b>Waschpuffer 2</b> (niedrig-stringent)	20 x SSC 10 % SDS H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	2,5 ml 5 ml ad 500 ml
<b>Maleinsäurepuffer</b>	NaCl Maleinsäure • pH 7,5 mit NaOH • mit DEPC behandeln, autoklavieren	150 mM 100 mM

<b>Detektionspuffer</b>	Tris/HCl pH 9,5	100 mM
	NaCl	100 mM
	• in H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	

## 4.6 Protein-Techniken

### 4.6.1 Zellaufschluss

#### 4.6.1.1 Gewinnung von Gesamtzellextrakt

Die bei -20 °C gelagerten Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut, frisch geerntete Zellen wurden direkt mit einer geeigneten Menge gekühltem RIPA-Puffer resuspendiert und 30 - 60 min auf Eis gestellt. Um einen vollständigen Zellaufschluss zu gewährleisten, wurden die Zellysate mit Ultraschall (30 - 45 s, *output* 0,45 - 0,6 Impulse/s; Branson Sonifier 450) behandelt, wobei die Reaktionsgefäße (Greiner) stets auf Eis gelagert wurden. Die Zellysate wurden anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt und zentrifugiert (11000 UpM, 3 min, 4 °C; Eppendorf Zentrifuge 5417R), um größere Zellfragmente abzutrennen. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) transferiert und für weitere Experimente verwendet.

<b>RIPA-Lysepuffer</b>	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	Nonidet P-40	1 % (v/v)
	SDS	0,1 % (w/v)
	Natriumdesoxycholat	0,5 % (w/v)

#### 4.6.1.2 Fraktionierter Zellaufschluss

Dies ist eine modifizierte Version des von Leppard und Shenk beschriebenen Protokolls zum fraktionierten Zellaufschluss (Leppard und Shenk, 1989). Für die Fraktionierung eignen sich nur frisch geerntete Zellen, da durch das Einfrieren die zellulären Membranen geschädigt werden und somit keine klare Trennung der

Kompartimente mehr möglich ist.

Alle Arbeits- und Inkubationsschritte wurden auf Eis, die Zentrifugationen bei 4 °C durchgeführt.

Die Zellen wurden mit Hilfe eines Plastikspatels (Sarstedt) vom Boden der Zellkulturflasche (Falcon) abgeschabt, in ein 50 ml Reaktionsgefäß (Falcon) überführt und 5 min bei 1500 UpM (Multifuge 3 S-R, Heraeus) zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml sterilem PBS gewaschen und bei gleichen Bedingungen wie vorher zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl isotonischem Puffer (IB) und 33,33 µl 10 %iger Nonidet P-40-Lösung (NP-40) resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt, gevortext und 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe 4 min bei 1000 UpM zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5417R). Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und als Zytoplasma-Fraktion bezeichnet. Das Pellet wurde anschließend mit 500 µl IB gewaschen, erneut zentrifugiert (3 min, 1000 UpM; Eppendorf Zentrifuge 5417R) und der Überstand zur Zytoplasma-Fraktion gegeben. Daraufhin wurde das Pellet in 500 µl IB, 16,7 µl NP-40 (10 %) und 8,3 µl 10 % SDC (Natriumdesoxycholat, *sodium desoxycholate*) aufgenommen und erneut zentrifugiert (4 min, 1000 UpM; Eppendorf Zentrifuge 5417R). Der abgenommene Überstand wurde als Kernmembran-Fraktion bezeichnet. Das Pellet wurde mit 333 µl RS-Puffer (RSB) gewaschen, wie vorher zentrifugiert und der Überstand zur Kernmembran-Fraktion gegeben. Nun folgte die Degradation der DNA; dazu wurde das Pellet in 300 µl RSB und 5 µl Desoxyribonuklease I (DNase I, 10 mg/ml; Roche) resuspendiert und 30 min inkubiert. Der Überstand, den man nach Zentrifugation (4 min, 1200 UpM, Eppendorf Zentrifuge 5417R) erhält, wurde als lösliche Kernfraktion bezeichnet. Anschließend erfolgte durch Zugabe von 300 µl RSB und 37,5 µl 5M NaCl ein Herauslösen des Chromatins aus dem Pellet. Nach einer Inkubation von 5 min und einem weiteren Zentrifugationsschritt (6 min, 2000 UpM, Eppendorf Zentrifuge 5417R) konnte die Chromatin-Fraktion abgezogen werden. Das verbleibende Sediment wurde in 333 µl F5-Puffer (F5B) resuspendiert und als nukleäre Matrix-Fraktion bezeichnet. Die gewonnenen Proteinfractionen wurden bei -20 °C gelagert.

<b>IB</b> (isotonischer Puffer)	Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
	NaCl	150 mM
	Protease Inhibitor Mix <i>Complete EDTA-free</i> ; Roche	1 Tablette pro 50 ml
<b>RSB</b>	Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
	NaCl	10 mM
	MgCl <sub>2</sub>	3 mM
<b>F5B</b>	EDTA	10 mM
	SDS	0,2 %
	IB	ad 15 ml

#### 4.6.2 Quantitative Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration löslicher Proteine einer Probe wurde mit Hilfe des *Protein-Assays* (BioRad) bestimmt. Dieses Testverfahren, das auf der Proteinquantifizierung nach Bradford beruht (Bradford, 1976), misst die auftretende Absorptionszunahme bei 595 nm, nachdem die vorhandenen Proteine an das chromogene Substrat dieses Testsystems gebunden haben. Die Proteinkonzentration in der Probe lässt sich durch Vergleich der gemessenen OD<sub>595</sub> mit den Werten einer Eichkurve ermitteln.

Unterschiedliche Verdünnungen der zu bestimmenden Proteinprobe bzw. 1 bis 20 µg des Eichproteins BSA (Rinderserumalbumin, Sigma) wurden in Polystyrol-Küvetten (Sarstedt) mit H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> jeweils auf ein Gesamtvolumen von 800 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 200 µl Färbereagenz 5 - 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm fotometrisch gegen den Nullwert (800 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> + 200 µl Färbereagenz) bestimmt.

#### 4.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine in Gegenwart eines hohen SDS-Überschusses elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dabei lagert sich das negativ geladene SDS in konstanten Gewichtsverhältnissen an die Proteine an und kompensiert deren positive Ladung so, dass die Wände-



rungsgeschwindigkeit der Proteine zur Anode allein durch deren Größe bestimmt wird. Die Qualität der Proteinauftrennung wird in diesem durch Laemmli etablierten Verfahren durch die Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems gesteigert, wobei die Proteine zunächst in einem niedrigprozentigen Sammelgel konzentriert werden und von dort gemeinsam in das Trenngel einwandern (Laemmli, 1970).

Durchführung:

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

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proteinproben mit dem gleichen Volumen eines zweifach konzentrierten SDS-Probenpuffers (Sambrook *et al.*, 1989) versetzt und 5 min im Heizblock (Eppendorf Thermomixer comfort) bei 95 °C denaturiert. Bei der Analyse von E1B-55K und E4orf6 wurden die mit SDS-Probenpuffer versetzten Proteinlysate für 12 min bei 55 °C im Heizblock (Eppendorf Thermomixer comfort) erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 20 mA pro Gel in TGS-Puffer bis die Bromphenolblau-Bande das Ende des Gels erreichte. Im Anschluss an die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese konnten die aufgetrennten Proteine über *Western Blot*-Analyse (4.6.4) detektiert werden.

<b>30 % Acrylamid-Stammlösung</b>	Acrylamid	29 % (w/v)
	N, N'Methylenbisacrylamid	1 % (w/v)
<b>Sammelgel (5 %)</b>	Acrylamid-Stammlösung	17 % (v/v)
	Tris/HCl, pH 6,8	120 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	APS	0,1 % (w/v)
	TEMED	0,1 % (v/v)
<b>Trenngel (8 %)</b>	Acrylamid-Stammlösung	27 % (v/v)
	Tris/HCl, pH 8,8	250 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	APS	0,1 % (w/v)
	TEMED	% (v/v)

## METHODEN

<b>Trenngel (12 %)</b>	Acrylamid-Stammlösung	40 % (v/v)
	Tris/HCl, pH 8,8	250 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	APS	0,1 % (w/v)
	TEMED	0,04 % (v/v)
<b>Trenngel (15 %)</b>	Acrylamid-Stammlösung	50 % (v/v)
	Tris/HCl, pH 8,8	250 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	APS	0,1 % (w/v)
	TEMED	% (v/v)
<b>TGS-Puffer</b>	Tris	25 mM
	Glycin	200 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
<b>SDS- Probenpuffer</b>	Tris/HCl, pH 6,8	100 mM
	SDS	4 % (w/v)
	DTT	200 mM
	Bromphenolblau	0,2 % (w/v)
	Glyzerin	20 %

### 4.6.4 *Western Blot*

#### Proteintransfer auf Nitrozellulose

Voraussetzung für den immunologischen Nachweis der geoelektrophoretisch aufgetrennten Proteine ist die Immobilisierung der Polypeptide auf Nitrozellulose-Membranen (Protran, Schleicher & Schuell) nach dem *Western Blot*-Verfahren. Der Transfer erfolgte mit Hilfe einer *Trans-Blot<sup>®</sup> Electrophoretic Transfer Cell* (BioRad) nach Anleitung des Herstellers in *Towbin*-Puffer bei einer Stromstärke von 400 mA für 30 min (E4orf3) bzw. 90 min. Zum Überprüfen des Transfers konnten die Proteine auf der Membran mit Ponceau S (Sigma) reversibel angefärbt werden. Zum Entfärben wurde die Membran mit Wasser gewaschen.

#### Bindung des spezifischen Antikörpers

Vor der Inkubation der Nitrozellulose mit einem spezifischen Antikörper wurden die freien Bindungsstellen der Membran durch Inkubation in PBS-Tween mit 5 % Mager-

milchpulver (Glücksklee) für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C abgesättigt. Anschließend wurde die Membran in einer Lösung des spezifischen Primärantikörpers (verschiedene Verdünnungen in PBS-Tween) für 1 h bei RT inkubiert. Nach der Bindung des primären Antikörpers wurde die Membran dreimal 5 min in PBS-Tween gewaschen und danach für 1 h in einer 1:5000 Verdünnung eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers geschüttelt. Nach drei weiteren Waschschrritten mit PBS-Tween für je 5 min folgte die Inkubation des Nitrozellulosefilters mit dem chemolumineszenten Substrat für die HRP-vermittelte Farbreaktion.

#### Detektion über Enzym-Substrat vermittelte Farbreaktion

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

In dem hier verwendeten System wird das zyklische Diacylhydrazid Luminol durch die an den anti-Immunglobulin-Antikörper gekoppelte Peroxidase unter alkalischen Bedingungen oxidiert, was zu einer Lichtemission mit einem Maximum bei 428 nm führt. Chemische Verstärker wie z.B. Phenol erhöhen die Lichtintensität um den Faktor 1000 und verlängern den Zeitraum der Emission, so dass eine maximale Intensität 5 - 20 min nach Einsetzen der Reaktion und eine anschließende Abnahme der Strahlung mit einer Halbwertszeit von 1 h zu beobachten sind.

Hierfür wurden nach Abgießen des letzten Waschpuffers die beiden Detektionslösungen 1:1 gemischt und in einer Menge von etwa 0,125 ml/cm<sup>2</sup> auf den Nitrozellulosefilter gegeben. Nach 5 min Inkubationszeit wurde der Filter kurz abgetropft und in Folie eingeschlagen. Die autoradiographische Detektion des Signals fand während Expositionszeiten zwischen 20 s und 20 min mit einem Röntgenfilm (CL-XPosure™ Film; Pierce) statt. Der Film wurde anschließend mit Hilfe von Entwicklungs- (*GBX Developer*, Kodak) und Fixierlösung (*GBX Fixer*, Kodak) nach Angaben des Herstellers entwickelt.

<b>PBS-Tween</b>		Tween-20	0,1 % (v/v)
		• in PBS	200 mM

<b>Towbin-Puffer</b>	Tris/HCl, pH 8,3	25 mM
	Glycin	200 mM
	SDS	0,05 % (w/v)
	Methanol	20 % (v/v)
<b>Ponceau S</b>	Ponceau S	0,2 % (w/v)
	Trichloressigsäure	3 % (w/v)
	Sulfosalicylsäure	3 % (w/v)

#### 4.6.5 Immunpräzipitation

Das Prinzip der Immunpräzipitation beruht auf der spezifischen Erkennung eines Zielproteins durch einen an eine Sepharose-Matrix gekoppelten Antikörper, was eine Isolierung von Proteinen bzw. Proteinkomplexen ermöglicht. Die Kopplung von Antikörpern aus Maus und Kaninchen erfolgte an Protein A-Sepharose (Sigma), die von Ratten-Antikörpern an Protein G-Sepharose (Sigma). Sowohl Protein A als auch G binden spezifisch an den Fc-Teil von Antikörpern, was eine indirekte Kopplung der Antikörper an die Sepharose-Matrix zur Folge hat. Der an die Sepharose-Matrix gebundene Protein-Antikörper-Komplex kann im Anschluss daran aufgrund des hohen Molekulargewichts der Sepharose durch Zentrifugation sedimentiert werden. Gebundene Proteine können daraufhin durch Erhitzen des Präzipitats für 3 - 5 min auf 95 °C in einem geeigneten Probenpuffer wieder in Lösung gebracht werden und anschließend im *Western Blot* (4.6.4) detektiert werden. Durch Koimmunpräzipitation ist es möglich, spezifische Bindungen von Proteinen an das vom Antikörper erkannte Protein nachzuweisen. Dabei ist die Stringenz des eingesetzten Lysepuffers von maßgeblicher Bedeutung.

#### Durchführung

Für 10 Ansätze wurden 30 mg lyophilisierte Protein A- oder G-Sepharose in 1 ml Lysepuffer (NP-40 oder RIPA-*light*) 1 h bei 4 °C in einem Überkopfschüttler (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) äquilibriert. Die Suspension wurde daraufhin bei 4 °C 5 min bei 6000 UpM abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge 5417, Eppendorf), das Sediment in 1 ml gekühltem Lysepuffer gewaschen und entweder in 1 ml Hybridom-

## METHODEN

---

überstand oder in 1 ml Lysepuffer sowie 10 – 20 µg gereinigtem Antikörper aufgenommen. Die Bindung der Antikörper an die Matrix fand während einer zweistündigen Inkubation bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) statt. Die Suspension wurde daraufhin erneut bei 6000 UpM für 5 min, 4 °C (Eppendorf Tischzentrifuge 5417, Eppendorf) abzentrifugiert, die Sepharose in 1 ml gekühltem Lysepuffer gewaschen, abzentrifugiert (6000 UpM, 5 min, 4 °C; Eppendorf Tischzentrifuge 5417, Eppendorf) und mit Lysepuffer wieder auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt. Pro Ansatz wurden 100 µl dieser Suspension mit der entsprechenden Menge Zelllysat (150 – 7500 µg Gesamtprotein) gemischt (4.6.2) und über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) inkubiert. Für den Nachweis von SUMO1-modifiziertem E1B wurde das Zelllysat zusätzlich mit 10 mM Iodacetamid (Sigma) versetzt. Zur Eliminierung unspezifischer Bindungen der Proteine aus dem Zelllysat mit der Sepharose-Matrix wurde der zu untersuchende Zellextrakt vorher mit je 100 µl der äquilibrierten Protein A- bzw. G-Sepharose für 1 h auf einem Überkopfschüttler (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) bei 4 °C inkubiert und nach Zentrifugation (6000 UpM, 5 min, 4 °C; Eppendorf Tischzentrifuge 5417, Eppendorf) eingesetzt. Die nach der Immunpräzipitation erhaltene Suspension wurde abzentrifugiert (6000 UpM, 5 min, 4 °C; Eppendorf Tischzentrifuge 5417, Eppendorf), dreimal mit je 1 ml gekühltem Lysepuffer gewaschen, zentrifugiert (6000 UpM, 5 min, 4 °C; Biofuge Eppendorf Tischzentrifuge 5417, Eppendorf) und das Sediment in 20 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, 3 min bei 95 °C aufgekocht und anschließend 5 min bei 13000 UpM abzentrifugiert (Biofuge Eppendorf Tischzentrifuge 5417, Eppendorf). Die Proben konnten nun im SDS-Polyacrylamidgel (4.6.3) aufgetrennt und weiter analysiert werden.

<b>NP-40</b> (niedrige Stringenz)	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	Nonidet P-40	0,15 % (v/v)
	Protease Inhibitor Mix	1 Tablette pro 50 ml
	<i>Complete EDTA-free ; Roche</i>	

<b>RIPA-light</b> (mittlere Stringenz)	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	Nonidet P-40	1 % (v/v)
	SDS	0,1 % (w/v)
	Triton X-100	0,1 % (v/v)
	Protease Inhibitor Mix <i>Complete EDTA-free ; Roche</i>	1 Tablette pro 50 ml

## 4.6.6 Immunfluoreszenz

### 4.6.6.1 Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA)

Subkonfluente, adhärenente Zellen wurden in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (6-well Schale; Falcon) auf sterilen Deckgläsern oder in 100 mm-Petrischalen auf sterilen Objektträgern bei 37 °C inkubiert. Je nach Experiment wurden am folgenden Tag Adenovirusinfektionen (4.3.4) bzw. Transfektionen (4.2.4) durchgeführt und die Zellen weitere 12 - 72 h inkubiert. Zur Fixierung der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Deckgläser bzw. die Objektträger einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 2 % Paraformaldehyd (in PBS) für 10 min bei RT inkubiert. Nach Entfernung des PFA erfolgte die Permeabilisierung durch PBS mit 0,5 % Triton X-100. Nach einer Inkubationsdauer von 15 min bei RT wurden die Zellen schließlich mit 4 % PFA (in PBS) für 10 min fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. In PBS ist eine Lagerung der Zellen bei 4 °C eine Woche möglich. Die anschließende Immunfärbung erfolgte wie unter 4.6.6.3 beschrieben.

### 4.6.6.2 Fixierung mit Methanol

Subkonfluente, adhärenente Zellen wurden wie unter 4.2.1 beschrieben kultiviert und gegebenenfalls transfiziert (4.2.4) oder infiziert (4.3.4). Zur Fixierung der Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Deckgläser bzw. Objektträger mit PBS gewaschen und für 15 min in eiskaltem Methanol bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen bei RT getrocknet und konnten bei -20 °C gelagert oder sofort für die Immunfluoreszenz (4.6.6.3) verwendet werden.

#### 4.6.6.3 Immunologischer Nachweis

Für die Immunfluoreszenz wurden die Deckgläser auf Parafilm (Pechiney Plastic Packaging) überführt und zur Absättigung unspezifischer Bindestellen 1 h in TBS-BG inkubiert. Bei Verwendung von Objektträgern wurden mit Hilfe eines Diamantkratzers kreisrunde Bereiche in diese geritzt und die umgebenden Flächen getrocknet, um ein Verlaufen der Antikörperlösungen zu verhindern. Die Absättigung unspezifischer Bindestellen erfolgt analog zur Deckglas-Methode. Nach Entfernen des Überstandes und einem Waschschriff mit PBS wurden pro Deckglas bzw. pro Färberegion des Objektträgers 30 µl Primärantikörper in geeigneter Verdünnung mit PBS zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert, um ein Eintrocknen der Antikörperlösung zu verhindern. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte auf die gleiche Weise die Inkubation mit dem sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper, der als 1:100 Verdünnung in PBS verwendet wurde. Zur Anfärbung der DNA-Chromatinkomplexe wurden 0,5 µg/ml DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol Dihydrochlorid) zugesetzt. Nichtgebundener Sekundärantikörper wurde durch die folgenden drei Waschschriffe mit PBS entfernt. Die Deckgläser wurden nun mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf einen Objektträger gelegt und mittels *Glow Mounting Medium* (EnerGene) eingebettet. Die zellbewachsenen Objektträger konnten ebenfalls mit *Glow Mounting Medium* (EnerGene) überschichtet und mit einem Deckglas bedeckt werden. Die Versuchsansätze konnten abgedunkelt bei 4 °C mehrere Tage bis wenige Wochen gelagert werden.

Die weitere Analyse erfolgte mit Hilfe des institutseigenen Immunfluoreszenzmikroskops (Leica) mit digitalem Bildverarbeitungssystem.

#### 4.7 Reporterversuche

Zur quantitativen Bestimmung von Promotoraktivitäten wurde das *Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System* (Promega) nach Anweisungen des Herstellers verwendet. Dazu wurde ein p53-induzierbares Promotor-DNA-Fragment (*responsive element*, RE) in den Vektor pGL2-Basic vor das *Firefly*-Luziferase-Gen aus dem Leuchtkäfer *Photinus*

*pyralis* kloniert (pRE-LUC) und zusammen mit einem konstitutiv p53-exprimierenden Plasmid (pC53SN53) in p53-negative H1299-Zellen transfiziert. Gleichzeitig wurden Expressionsplasmide verschiedener E1B-Mutanten kotransfiziert und deren Auswirkungen auf die Promotoraktivität von pRE-LUC untersucht. Die Promotoraktivität beeinflusst die Synthese der Luziferase, deren Menge lunimometrisch durch die Oxidation des Substrates Luziferin bestimmt wurde. Als interne Kontrolle wurde zusätzlich der Vektor pRL-TK transfiziert, der das *Renilla*-Luziferase-Gen aus *Renilla reniformis* unter Kontrolle des konstitutiven Thymidin-Kinase-Promotors enthält. Beide Luziferasen sind unter unterschiedlichen Bedingungen aktiv und können somit unabhängig voneinander angeregt und vermessen werden. Die Messung der *Renilla*-Luziferase (pRL-TK) wurde dazu benutzt die verschiedenen Lysate zu normieren und der Wert der Promotoraktivität wurde als Quotient aus *Firefly*-Luziferase-Aktivität zu *Renilla*-Luziferase-Aktivität berechnet.

Für die Versuche wurden  $2 \times 10^5$  H1299-Zellen in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (6-well Schale; Falcon) ausgesät und am nächsten Tag mit 0,1 µg pRL-TK, 0,25 µg pRE-LUC, 25 ng pC53SN3 sowie unterschiedlichen Mengen an E1B-Expressionskonstrukten mit der Liposomenmethode transfiziert (4.2.4.2). Nach 48 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, 300 µl *passive lysis buffer* (Promega) pro Ansatz auf die Zellen gegeben und 20 min bei RT inkubiert. Durch Pipettieren wurden die Zellen daraufhin vollständig abgelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff vollständig lysiert. Nach dem Auftauen wurden die Zellfragmente bei RT für 5 min bei 14000 UpM (Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) abzentrifugiert und der Überstand konnte bei Bedarf für 2 Wochen bei -20 °C gelagert werden. Alle weiteren Arbeitsschritte zur Ermittlung der Promotoraktivität wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und die Promotoraktivitäten mit einem Luminometer (Lumat LB 9507, Berthold) bestimmt.



## 5 Ergebnisse

---

---

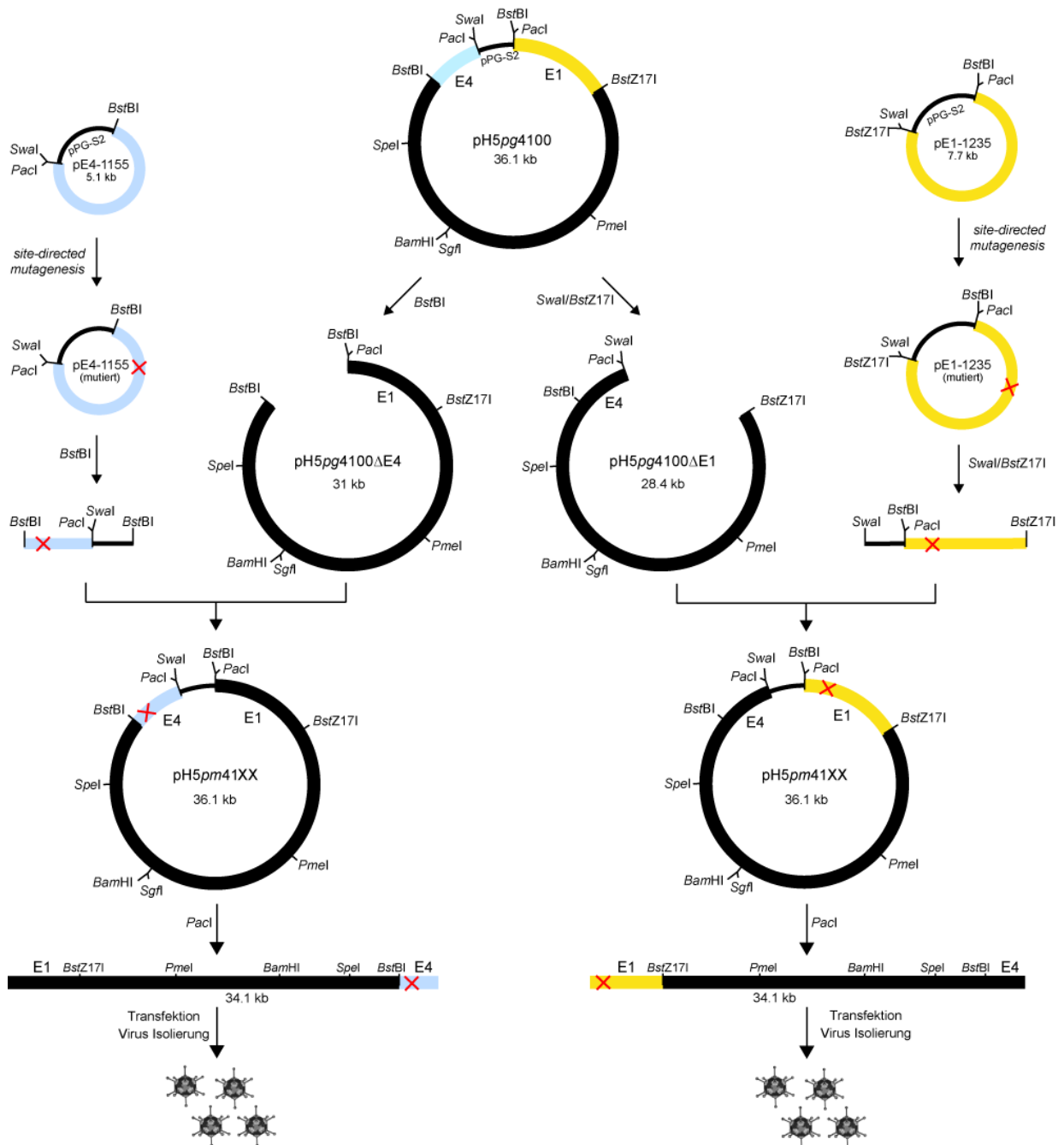
### 5.1 Klonierungssystem zur Herstellung von Adenoviren, die Punktmutationen in der E1- bzw. E4-Region tragen

Bisher wurden die Auswirkungen von Punktmutationen in adenoviralen Proteinen auf die virale Replikation v. a. mit Hilfe von Transfektions-/Infektionsanalysen untersucht. Dabei wird ein Plasmid, das für das punktmutierte Protein kodiert in die Zielzellen transfiziert und diese nach 24 h mit einem Adenovirus, dem das jeweilige Protein fehlt, infiziert. Mit dieser Methode können zwar die Auswirkungen der Mutation abgeschätzt werden, jedoch keine genaueren Aussagen gemacht werden, da die Stöchiometrie der an den Reaktionen beteiligten Proteine nicht den natürlichen Bedingungen entspricht. Diese veränderten Mengenverhältnisse können den Ablauf der beobachteten Reaktionen beeinflussen und somit zu fehlerhaften Schlussfolgerungen führen.

Der einzige Weg sichere Daten im viralen Kontext zu erhalten ist die Herstellung von Adenoviren, die definierte AS-Austausche im viralen Protein tragen. Deshalb wurde von Peter Groitl und Thomas Zeller in unserer Arbeitsgruppe ein System etabliert (Zeller, 2004), bei dem die schnelle zielgerichtete Veränderung der E1- bzw. der E4-Region mit dem direkten Klonieren in das 36 kb große Ad5-Genom kombiniert wurde (Abb. 4).

Im ersten Schritt wurde aus dem Ad5-Bacmid ein kleiner Bereich subkloniert, der die E1- bzw. die E4-Region von Ad5 und den bakteriellen Vektoranteil enthielt (E1-Box, pE1-1235 bzw. E4-Box, pE4-1155). In die Sequenz der E1- bzw. der E4-Region wurden dann die gewünschten Mutationen mit Hilfe des *QuikChange<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kits* (Stratagene) eingeführt. Als nächstes erfolgte die Rückklonierung der modifizierten E1- bzw. E4-Box in das Ad5-Bacmid. Im Anschluss wurde das Bacmid mit *PacI* linearisiert und somit der bakterielle und der virale Anteil getrennt. Nun konnte die doppelsträngige Virus-DNA im Falle von E1B-Mutanten in die Ad5

E1-transformierte Helferzelllinie 911 bzw. bei Mutationen in E4orf6 in die Helferzelllinie H1299S, die stabil E4orf6 exprimiert, transfiziert und die Virusmutanten wie unter 4.3.1 beschrieben geerntet werden.



**Abb. 4 Klonierungsschema zur Herstellung von Adenoviren, die Punktmutationen in der E1- bzw. E4-Region tragen**

In die E1-Region (gelb; pE1-1235) bzw. die E4-Region (blau; pE4-1155) konnten mit Hilfe des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene) Mutationen an definierten AS-Positionen eingeführt werden (rotes X). Anschließend wurden die mutierten Plasmide über *SwaI*/*BstZ171* bei E1-Box-Mutanten bzw. über *BstBI* bei E4-Box-Mutanten in das Ad5 Bacmid (pH5pg4100Δ) zurückkloniert.

Die daraus resultierenden Plasmide wurden nach ihrer Nummer in der Datenbank der Arbeitsgruppe bezeichnet. Die XX in pH5pm41XX stehen für die Zahlen 01 bis 99. Die Plasmide wurden danach mit *PacI* linearisiert und im Falle von E1B-Mutanten in die Helferzelllinie 911, bei Mutationen in der E4-Region in die Helferzelllinie H1299S transfiziert. Aus den Zellen konnten dann nach mehrmaligen Reinfektionen große Mengen an infektiösen Viruspartikeln isoliert werden.

## 5.2 Charakterisierung der Virusmutanten H5pm4101, H5pm4102 und H5pm4103

Ad5 E1B-55K ist ein multifunktionelles Protein, das eine entscheidende Rolle während der produktiven Adenovirusinfektion spielt. Der Ausgangspunkt dieser Arbeiten war die Beobachtung, dass das Ad5 E1B-55K-Protein eine nukleozytoplasmatische Pendelaktivität besitzt, die über zwei eng benachbarte Motive im aminoterminalen Bereich des viralen Polypeptids reguliert wird. Der Kernexport wird durch ein Leucin-reiches NES vom HIV Rev-Typ vermittelt (Krätzer *et al.*, 2000), während die effiziente Akkumulation des 55K-Polypeptids im Kern von der kovalenten Bindung des Ubiquitin-ähnlichen Proteins SUMO1 abhängig ist (Endter *et al.*, 2001). Ausgehend von diesen Beobachtungen sollte zunächst die Rolle der nukleozytoplasmatischen Pendelaktivität von E1B-55K für die virale Replikation untersucht werden.

Dazu wurden drei E1B-55K-Virusmutanten H5pm4101, H5pm4102 und H5pm4103, die von Peter Groitl und Thomas Zeller aus der Arbeitsgruppe hergestellt wurden, untersucht (Abb. 4 und 5). H5pm4101 enthält drei AS-Austausche im Leucin-reichen NES (L83A, L87A, L91A), während bei H5pm4102 das Lysin 104 im SUMO1-Konjugationsmotiv (SKM) gegen Arginin (K104R) ausgetauscht wurde. H5pm4103 ist eine Doppelmutante, die AS-Austausche im NES (L83A, L87A, L91A) und im SKM (K104R) des 55K-Proteins trägt. Als weitere Virusmutante wurde *dl1520* verwendet, die aufgrund einer Deletion und Punktmutation im E1B-Gen kein 55K-Protein produzieren kann (Barker und Berk, 1987). H5pg4100 diente als Ad5 Wildtypvirus. Alle untersuchten Virusmutanten enthalten eine Deletion in der frühen Region 3 (E3), die jedoch keinen erkennbaren Einfluss auf die virale Replikation in Zellkultur hat.

	<u>NES</u>	<u>SKM</u>	
80	VAELYP <b>L</b> PE <b>L</b> RR <b>I</b> L <b>T</b> IT <b>E</b> DG <b>Q</b> GL <b>K</b> GV <b>K</b> R <b>R</b> E <b>R</b> G <b>A</b> C		110 H5pg4100
	··· <b>A</b> ··· <b>A</b> ··· <b>A</b> ··········		H5pm4101
	·········· <b>R</b> ······		H5pm4102
	··· <b>A</b> ··· <b>A</b> ··· <b>A</b> ·········· <b>R</b> ······		H5pm4103

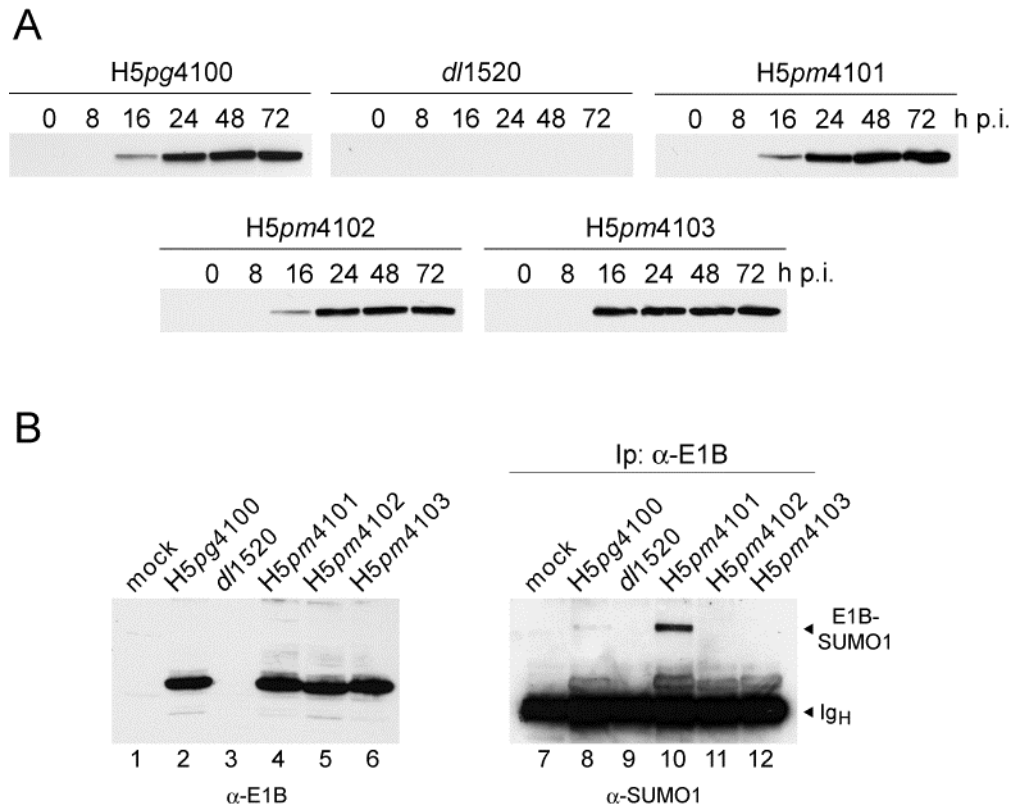
**Abb. 5 NES- und SKM-Mutationen im E1B-55K-Protein**

Dargestellt ist ein Sequenzausschnitt von Ad5 E1B-55K, der mit der angegebenen AS-Position beginnt. Markiert sind die AS-Positionen des Leucin-reichen NES (AS-Reste 83 - 93) und des SKM (AS-Rest 104) im Wildtypprotein (H5pg4100) und in den Virusmutanten E1B-NES (H5pm4101), E1B-SKM (H5pm4102) und E1B-SKM/NES (H5pm4103). Punkte kennzeichnen jeweils gleiche AS.

### 5.2.1 Mutationen im NES führen zu einer erhöhten SUMO1-Modifikation des E1B-55K-Proteins

Als erstes wurden die Gleichgewichtsmengen der verschiedenen E1B-55K-Proteine im Verlauf der Infektion untersucht. Dazu wurden die Zelllinie A549 und HeLa wie unter 4.3.4 beschrieben infiziert, nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet (4.6.1.1) und mit Hilfe von *Western Blot*-Analysen untersucht. Da die Ergebnisse beider Zelllinien nahezu identisch waren, wurden nur die Resultate für A549-Zellen dargestellt (Abb. 6).

Die verschiedenen Virusmutanten (ausgenommen dl1520) zeigen im Vergleich zum Wildtypvirus H5pg4100 keine signifikanten Unterschiede bei der Expression des E1B-55K-Proteins (Abb. 6 A). Man kann daraus schließen, dass weder die Inaktivierung des NES noch die des SKM einen Einfluss auf die Synthese bzw. auf die Stabilität der E1B-Proteine haben.



**Abb. 6 Gleichgewichtsmengen und SUMO1-Modifikation verschiedener E1B-Mutanten in infizierten Zellen**

(A) A549-Zellen wurde mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 20) und zu den angegebenen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet. Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht infiziert (mock). Es wurden je 50 µg Gesamtzellextrakt über 10 %ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt und mittels *Western Blot* auf Nitrozellulose transferiert. Der Nachweis von E1B-55K erfolgte mit dem Maus-Antikörper 2A6. (B) MCF7-Zellen wurden mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 50) und 24 h p.i. geerntet. 100 µg Gesamtzellextrakt wurde über 10 %ige SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit dem E1B-Antikörper 2A6 inkubiert (Spuren 1 - 6). Zur Koimmunpräzipitation wurden 7 mg Zellysate mit dem E1B-Antikörper 2A6 immunpräzipitiert, über 10 %ige SDS-Gele aufgetrennt, anschließend mittels *Western Blot* auf Nitrozellulose transferiert und mit dem Antikörper gegen SUMO1 (21C7) inkubiert (Spuren 7 - 12). Die Pfeile markieren das SUMO1-modifizierte E1B-Protein (E1B-SUMO1) und die schwere Kette der IgGs (Ig<sub>H</sub>).

Mittels Immunpräzipitation, gefolgt von *Western Blot*-Analysen konnte in Wildtypvirus-infizierten Zellen (H5pg4100) die ca. 75 K schwere SUMO1-modifizierte Form von E1B nachgewiesen werden (Abb. 6, Spur 8). Während die Menge an SUMO1-modifiziertem E1B-55K im Falle des wt-Proteins sehr gering ist (Abb. 6, Spur 8), führen Mutationen im NES zu einer deutlich gesteigerten SUMOylierung des E1B-55K-Proteins (Abb. 6, Spur 10). Wie erwartet verhindert die Punktmutation an Position 104 sowohl bei der Einzelmutante H5pm4102 (Abb. 6, Spur 11) als auch bei der SKM/NES-Doppelmutante H5pm4103 (Abb. 6, Spur 12) die Modifikation mit

SUMO1.

## **5.2.2 Mutationen im NES und SKM führen zu einer veränderten subzellulären Lokalisation von E1B-55K in infizierten Zellen**

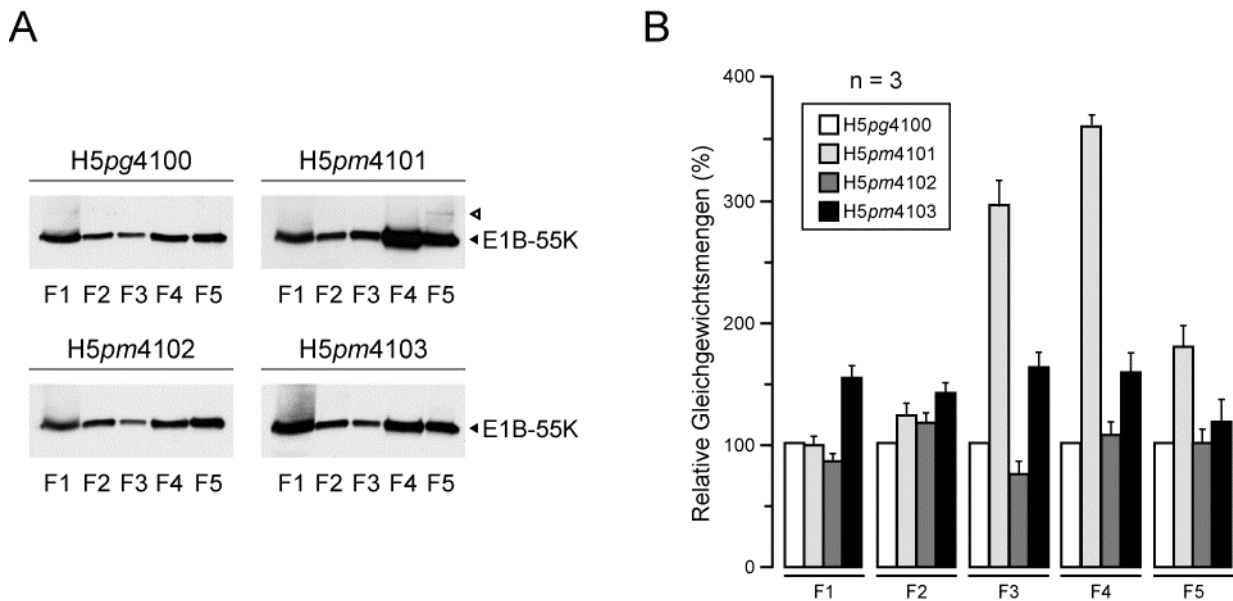
### **5.2.2.1 Subzelluläre Fraktionierung**

Im nächsten Schritt sollte der Einfluss der Mutationen auf die subzelluläre Verteilung des E1B-55K-Proteins in infizierten Zellen untersucht werden. Frühere Untersuchungen zeigten, dass das E1B-55K-Protein selbstständig zwischen Zellkern und Zytoplasma pendeln kann. Dazu notwendig ist das aminoterminalen NES des E1B-55K-Proteins (Krätzer *et al.*, 2000; Dosch *et al.*, 2001) und vermutlich auch die kovalente Verknüpfung mit SUMO1 (Endter *et al.*, 2001; Endter, 2002). Die Rolle der nukleozytoplasmatischen Pendelaktivität und der dafür verantwortlichen regulatorischen Bereiche (NES und SKM) in virusinfizierten Zellen ist bisher noch unklar. Deshalb wurde die Funktion der beiden Motive in Bezug auf die Lokalisation des E1B-55K-Proteins untersucht. Zudem zeigten neuere Untersuchungen, dass es auch bei der E4orf6-defizienten Mutante H5dl355 zu einer verstärkten SUMOylierung des E1B-Proteins kommt. Diese erhöhte SUMO1-Modifikation spiegelt sich in einer erhöhten Matrix-Assoziation des E1B-Proteins wider (Lethbridge *et al.*, 2003).

Unter dem Begriff nukleäre Matrix ist ein Komplex aus Proteinen zusammengefasst, die das innere Strukturnetzwerk des Zellkerns ausbilden und mit Funktionen wie DNA-Replikation, RNA-Synthese und der Hormonbindung assoziiert sind (zur Übersicht: Nickerson, 2001). Methodisch ist die nukleäre Matrix definiert als unlösliche Struktur, die nach Abtrennung von Chromatin und löslichen nukleären Proteine verbleibt (Berezney und Coffey, 1974).

Zur Untersuchung der Lokalisation von E1B wurde ein Protokoll verwendet (4.6.1.2), welches die sequenzielle Abtrennung von löslichen Proteinen beinhaltet. Dabei wurden A549-Zellen mit den Virusmutanten infiziert (moi 20), 24 h p.i. geerntet, und die zytoplasmatischen Proteine (F1) von den intakten Zellkernen abgetrennt. Im weiteren Verlauf wurden Proteine, die mit der Kernmembran assoziiert sind (F2),

anschließend lösliche nukleoplasmatische Proteine (F3) extrahiert. Durch den Abbau genomischer DNA wurden die Proteinbestandteile des Chromatins erhalten (F4). Die verbliebene unlösliche nukleäre Matrix wurde schließlich durch die Resuspension mit Lysepuffer solubilisiert (F5). Die Proteine der erhaltenen Fraktionen wurden daraufhin mittels *Western Blot* analysiert (4.6.3; Abb. 7).



**Abb. 7 Nachweis der Lokalisation des E1B-55K-Proteins durch fraktionierten Zellaufschluss**

(A) Subkonfluente A549-Zellen wurden mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 20), 24 h p.i. geerntet und fraktioniert. Von den Fraktionen wurden Aliquots auf 12 %ige SDS-Gele aufgetragen. Das E1B-55K-Protein konnte durch *Western Blot*-Analyse mit dem E1B-55K-spezifischen Maus-Antikörper 2A6 nachgewiesen werden. (B) Die Intensität der in 3 Versuchen erhaltenen Banden wurde mit Hilfe der ImageJ-Software (Abramoff *et al.*, 2004) bestimmt und graphisch dargestellt. Die Werte des Wildtypvirus dienten als Referenzwert und wurden auf 100 % normiert. F1: Zytoplasmafraktion; F2: Kernmembranfraktion; F3: lösliche Kernfraktion; F4: Chromatinfraktion; F5: nukleäre Matrix-Fraktion.

Die Fraktionierung ergab, dass in allen fünf Fraktionen das E1B-55K-Protein nachgewiesen werden konnte. Dabei unterscheidet sich das Verteilungsmuster der SKM-Mutante H5pm4102 und der Doppelmutante H5pm4103 nur schwach vom Wildtypvirus H5pg4100. Auffallend ist jedoch die E1B-NES-Virusmutante H5pm4101. Hier konnten deutlich stärkere Signale in den Kern-Fraktionen detektiert werden. Am deutlichsten ist der Anstieg in der löslichen (F3) und der Chromatinfraktion (F4) im Vergleich zu den anderen Virusmutanten. Dies deutet darauf hin, dass die Muta-

tionen im NES zu einer Akkumulation des E1B-Proteins im Kern führen. Zudem kann man in der Matrixfraktion F5 eine Bande bei ca. 75 K erkennen. Bei dieser Bande könnte es sich um die SUMO1-modifizierte Form des E1B-Proteins handeln.

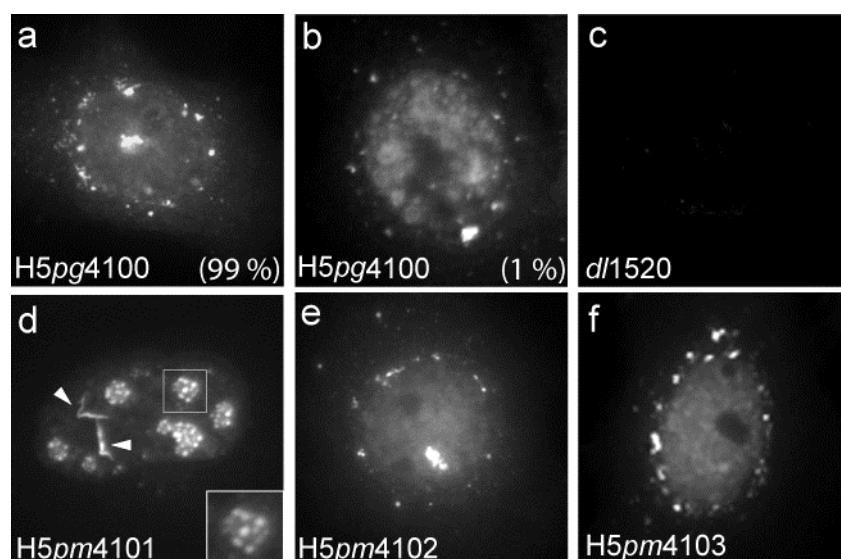
### 5.2.2.2 Immunfluoreszenzanalysen

Bisherige Arbeiten ergaben, dass das E1B-55K-Protein in virusinfizierten Zellen ein komplexes Muster sowohl nukleärer als auch zytoplasmatischer Lokalisation zeigt (Grand und Gallimore, 1984; Smiley *et al.*, 1990). Im Zytoplasma kommt das E1B-Protein einerseits in einer diffusen Verteilung vor, andererseits lokalisiert es in einer oder auch mehreren als *perinuclear bodies* bezeichneten Strukturen am Rande des Nukleus. Im Zellkern ist das Polypeptid ebenfalls diffus verteilt, wobei die Bereiche der Nukleoli ausgeschlossen sind. Darüber hinaus lokalisiert E1B-55K auch spezifisch an nukleären Strukturen, die wahrscheinlich die viralen Transkriptions- und Replikationszentren darstellen (Ornelles und Shenk, 1991). Man nimmt an, dass die differenzielle subzelluläre Verteilung des E1B-55K-Proteins durch spezifische Interaktionen mit zellulären und viralen Faktoren sowie durch Oligomerisation reguliert wird (Grand und Gallimore, 1984; Grand *et al.*, 1995).

Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass das E1B-55K-Protein in der frühen Phase der Infektion mit fibrillären, subnukleären Strukturen assoziiert ist, die als promyelozytische Leukämie (PML) *oncogenic domains* (PODs), bezeichnet werden (Doucas *et al.*, 1996; König *et al.*, 1999) und wahrscheinlich eine wichtige Rolle im Replikationszyklus vieler Viren spielen. Für die Lokalisation des E1B-Proteins in diesen Strukturen ist das adenovirale Protein E4orf3 verantwortlich (König *et al.*, 1999; Leppard und Everett, 1999). In der späten Phase der Infektion verliert das E1B-55K-Protein seinen Kontakt zu diesen fibrillären Strukturen und gelangt zu den viralen Transkriptions- und Replikationszentren. Dabei spielt wahrscheinlich das E4orf6-Protein, das mit dem E1B-55K-Protein in infizierten Zellen assoziiert ist, eine Rolle (Sarnow *et al.*, 1984; Ornelles und Shenk, 1991; Rubenwolf *et al.*, 1997).

Zunächst wurde die Lokalisation des E1B-55K-Proteins in infizierten A549-Zellen 20 h p.i. mit Immunfluoreszenzanalysen (4.6.6) bestimmt (Abb. 8).





**Abb. 8 Immunfluoreszenzanalysen zur subzellulären Lokalisation des E1B-55K-Proteins in infizierten A549-Zellen**

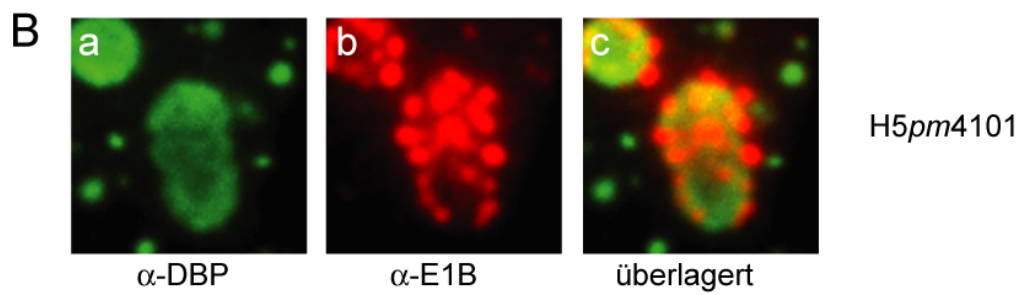
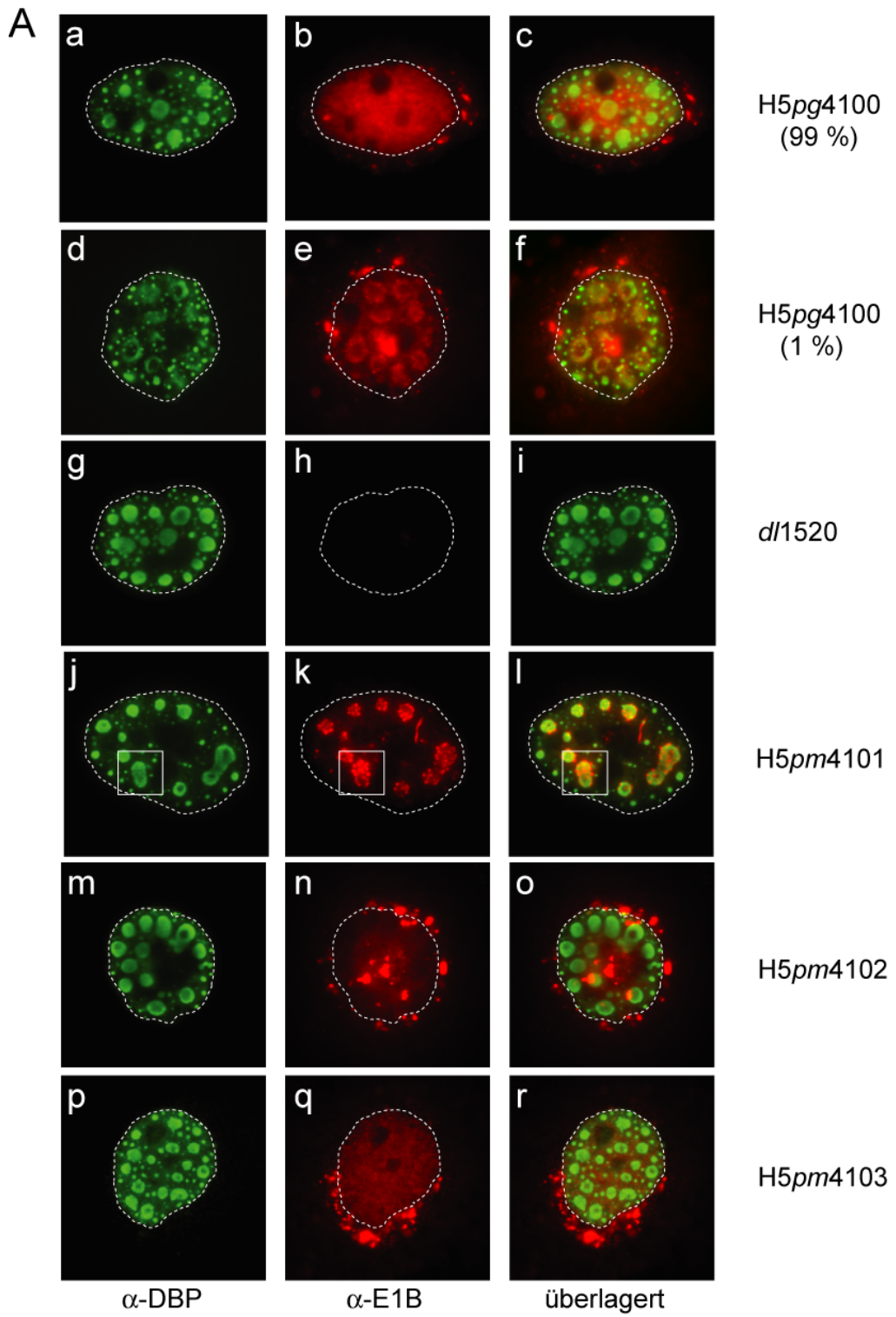
A549-Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät und bei einer Konfluenz von 60 % mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 20). Die Zellen wurden 20 h p.i. mit Methanol fixiert und *in situ* mit dem für das E1B-55K-Protein spezifischen Antikörper 2A6 inkubiert. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte mit einem FITC-gekoppelten anti-Maus-Antikörper. Im Bild d wurde der umrandete Bereich mittels Adobe Photoshop CS 5-fach vergrößert.

In Zellen, die mit dem Wildtypvirus H5pg4100 infiziert wurden, zeigt das E1B-55K-Protein wie erwartet ein komplexes Lokalisationsmuster. Bei einem Großteil der Zellen (ca. 99 %) ist das E1B-Protein sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern diffus verteilt. Zudem befindet sich das E1B-55K-Protein in vielen kleinen, meist punktförmig angefärbten Strukturen in der Nähe des Zellkerns (Abb. 8 a). Bei ca. 1 % der Wildtypvirus-infizierten Zellen lokalisiert das E1B-Protein an kreisförmigen nukleären Strukturen, bei denen es sich um die viralen Transkriptions- und Replikationszentren handeln könnte. Im Gegensatz dazu befindet sich das E1B-55K-Protein der Virusmutante H5pm4101 fast ausschließlich im Zellkern. Es lokalisiert dort zum einen in länglichen, fädigen Strukturen (Abb. 8 d; Pfeil), zum anderen in nahezu runden Einheiten, die selbst wiederum aus punktförmigen Strukturen zusammengesetzt sind (Abb. 8 d). Bei letzteren könnte es sich ebenfalls um die viralen Transkriptions- und Replikationszentren handeln. Die unterschiedliche Lokalisation des E1B-55K-Proteins in H5pm4101- und in Wildtypvirus H5pg4100-infizierten Zellen zeigt,

dass die Mutation des NES zusammen mit der erhöhten SUMO1-Modifikation des E1B-Proteins zu einer nukleären Akkumulation von 55K vor allem in den Fraktionen F3 und F4 führt (Abb. 7 und 8). Das Lokisationsmuster des E1B-55K-Proteins der Virusmutanten H5pm4102 und H5pm4103 ähnelt dem des Wildtypvirus. Das E1B-55K-Protein zeigt eine diffuse zytoplasmatische und nukleäre Verteilung. Außerdem enthalten die Zellen mehrere stärker gefärbte Strukturen im Zytoplasma und in der Nähe des Zellkerns (Abb. 8 e, f). Im Vergleich zur Doppelmutante H5pm4103 ist die diffuse Lokalisation des E1B-Proteins in der SKM-Mutante H5pm4102 etwas stärker ausgeprägt (Abb. 8 e). Es konnten jedoch weder bei der Virusmutante H5pm4102 und überraschenderweise auch nicht bei der Doppelmutante nukleäre Strukturen, die den viralen Transkriptions- und Replikationszentren ähneln, detektiert werden. Da das E1B-Protein der Doppelmutante auch ohne funktionelles NES aus dem Kern exportiert wird, jedoch keine nukleären Aggregate mehr bilden kann, legt dies den Verdacht nahe, dass die Modifikation mit SUMO1 nicht nur wichtig für die intranukleäre Lokalisation des E1B-55K-Proteins ist, sondern auch eine wichtige Rolle beim nukleären Export von E1B hat. Die dl1520-infizierten Zellen waren erwartungsgemäß E1B negativ (Abb. 8 c).

### **5.2.2.3 Die Inhibition des CRM1-abhängigen Kernexports führt zu einer Kolokalisation von E1B-55K mit E2A-72K**

Um aufzuklären, ob es sich bei den kreisförmigen nukleären Strukturen im Wildtypvirus H5pg4100 (Abb. 8 b) und vor allem in der NES-Virusmutante H5pm4101 (Abb. 8 d) um die viralen Replikations- und Transkriptionszentren handelt, wurden wiederum Immunfluoreszenzanalysen (4.6.6) mit infizierten A549-Zellen 20 h p.i. durchgeführt. Als Markerprotein wurde das Einzelstrang-DNA-bindende Protein (DBP) E2A-72K verwendet, das selbst mit den viralen Replikations- und Transkriptionszentren kolokalisiert (Puvion-Dutilleul *et al.*, 1984; Puvion-Dutilleul und Puvion, 1990b; Puvion-Dutilleul und Puvion, 1990a; Boshier *et al.*, 1992; Abb. 9).



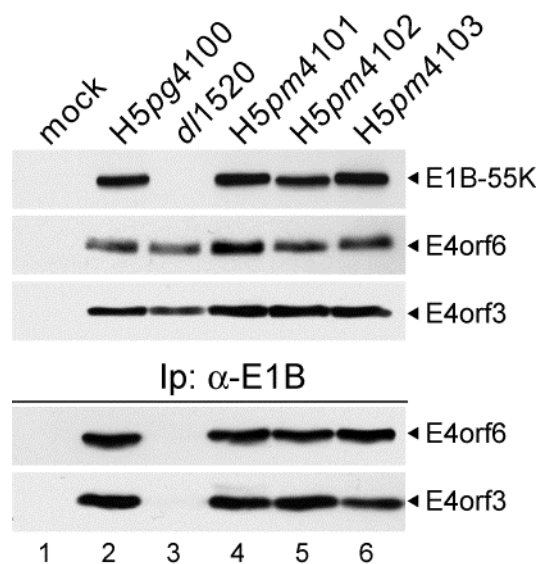
**Abb. 9 Immunfluoreszenzanalysen zur Kollokalisierung von E1B-55K und E2A-72K**

(A) A549-Zellen wurden auf Objektträger ausgesät und bei einer Konfluenz von 60 % mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 20). Die Zellen wurden 20 h p.i. mit PFA fixiert und *in situ* mit dem anti-E1B-55K-Antikörper 7C11 aus Ratte und dem anti-DBP-Antikörper B6-8 aus Maus doppelmarkiert. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte mit einem *Texas Red*-gekoppelten anti-Ratte-Antikörper und einem FITC-gekoppelten anti-Maus-Antikörper. Überlagerungen der Lokalisationen von DBP (grün; a, d, g, j, m, p) und E1B-55K (rot; b, e, h, k, n, q) sind in c, f, i, l, o und r dargestellt. Die gestrichelten Linien in den Bildern geben jeweils die Lage und Größe des Zellkerns an. (B) 5-fache Vergrößerung der in den Bildern j, k und l umrandeten Bereiche mittels Adobe Photoshop CS.

In allen untersuchten Virusmutanten war das E2A-72K-Protein diffus im Zellkern verteilt, wobei der größte Teil in kreisförmigen subnukleären Strukturen organisiert war, die die Orte viraler Replikation und Transkription darstellen. Da die Lokalisation und Expression von DBP in allen Virusmutanten annähernd gleich war, kann man auf einen vergleichbaren Verlauf der Infektionen in den verschiedenen Viren schließen. Bei einem Großteil der Wildtypvirus-infizierten Zellen (ca. 99 %) konnte keine Kollokalisierung von E1B-55K mit DBP festgestellt werden (Abb. 9 A; a – c). Bei einigen Zellen (ca. 1 %), in denen sich das E1B-55K-Protein in kreisförmigen, subnukleären Strukturen befindet, handelt es sich tatsächlich um die viralen Replikations- und Transkriptionszentren (Abb. 9 A; d – f). Auch in Zellen, die mit der Virusmutante H5pm4101 infiziert wurden, bestätigte sich die Vermutung, dass es sich bei den subnukleären Strukturen des E1B-Proteins um die viralen Replikations- und Transkriptionszentren handelt (Abb. 9 A; j – k). Bei einer stärkeren Vergrößerung kann man erkennen, dass das E1B-Protein punktförmig an der Peripherie der DBP-positiven Strukturen lokalisiert (Abb. 9 B; a – c). Im Gegensatz dazu verhindern die Punktmutationen in den Virusmutanten H5pm4102 (Abb. 9 A; m – o) und H5pm4103 (Abb. 9 A; p – r) die Kollokalisierung mit DBP.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Inaktivierung des NES zusammen mit einer erhöhten SUMO1-Modifikation von E1B-55K zu einer nukleären Akkumulation des 55K-Proteins an der Peripherie der viralen Replikations- und Transkriptionszentren führt. E1B-Proteine, die nicht mehr SUMO1-modifiziert werden können, verlieren diese Lokalisation völlig.

Eine weitere Erklärung für die veränderte subzelluläre Verteilung der mutierten E1B-55K-Proteine könnte der Verlust einer Interaktion mit zellulären und viralen Faktoren sein. Dabei spielen vor allem die Proteine E4orf3 und E4orf6 eine wichtige Rolle, die bekanntermaßen mit dem E1B-Protein wechselwirken und zu einer Umverteilung des E1B-Proteins führen können (Sarnow *et al.*, 1984; Ornelles und Shenk, 1991; Rubenwolf *et al.*, 1997; König *et al.*, 1999; Leppard und Everett, 1999). Die veränderte Lokalisation der E1B-Mutanten könnte deshalb mit dem Verlust der Interaktion mit einem der beiden adenoviralen E4-Proteine in Verbindung stehen. Um dies zu überprüfen, wurden kombinierte Koimmunpräzipitations-/*Western Blot*-Analysen (4.6.5) mit Gesamtzellextrakt aus infizierten A549-Zellen durchgeführt (Abb. 10).



**Abb. 10 Interaktion von E1B-55K mit E4orf3 und E4orf6**

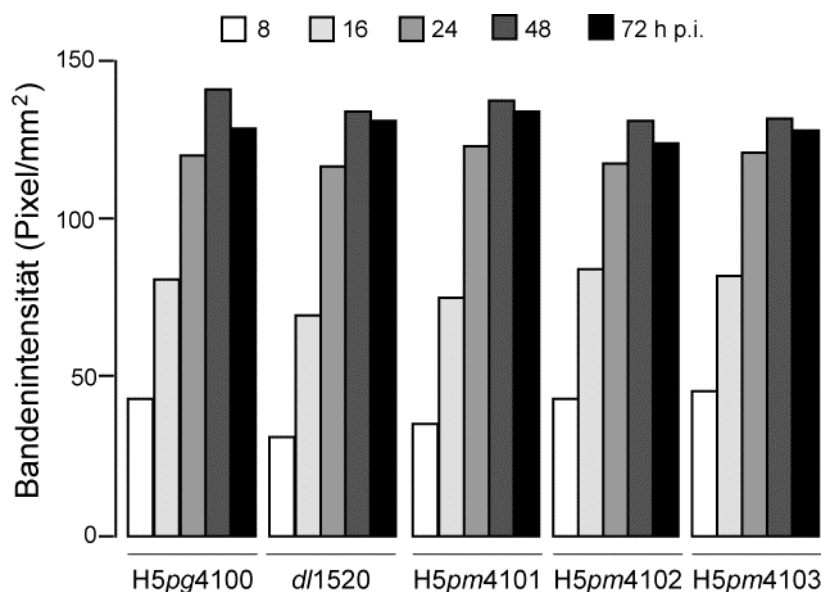
A549-Zellen wurden mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 20) und 24 h p.i. geerntet. Zur Überprüfung der Expression wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (50 µg für E1B, 100 µg für E4orf3 und E4orf6) über 12 %ige (E1B und E4orf6) bzw. 15 %ige (E4orf3) SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Antikörpern gegen E1B (7C11), E4orf6 (1807) und E4orf3 (6A11) inkubiert (Spuren 1 - 6). Zur Koimmunpräzipitation wurde das Zelllysate vor dem *Western Blot* mit dem E1B-Antikörper 2A6 immunpräzipitiert und dann über 12 %ige (E4orf6) bzw. 15 %ige (E4orf3) SDS-Gele aufgetrennt. Anschließend mittels *Western Blot* auf Nitrozellulose transferiert und mit Antikörpern gegen E4orf6 (1807) und E4orf3 (6A11) inkubiert.

Die E1B-Proteine aller untersuchten Virusmutanten sind in der Lage, sowohl an E4orf3 als auch an E4orf6 zu binden. Dies zusammen mit den Immunfluoreszenz-

analysen zeigt, dass die veränderte Lokalisation der verschiedenen E1B-Proteine der Virusmutanten H5pm4101, H5pm4102 und H5pm4103 nicht auf den Verlust der Wechselwirkung mit E4orf3 und E4orf6 zurückzuführen ist. Somit ist die Inaktivierung des NES bzw. der Verlust der SUMO1-Modifikation direkt für die veränderte Lokalisation von E1B der verschiedenen Virusmutanten verantwortlich.

### 5.2.3 Mutationen im NES und SKM haben keinen Einfluss auf die virale DNA-Synthese

Im Folgenden wurde überprüft, ob die verschiedenen AS-Austausche in E1B-55K einen Einfluss auf die Initiation der viralen DNA-Replikation haben. Das Einsetzen sowie der Verlauf der DNA-Replikation wurden durch ein modifiziertes PCR-Verfahren aus virusinfizierten Zellen bestimmt. Dazu wurden die Zelllinien A549 und HeLa mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (4.3.4), nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und aufgeschlossen (4.2.5 und 4.6.1.1). Die PCR-Reaktion wurde wie unter 4.4.5.3 beschrieben durchgeführt. Die Reaktionsprodukte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert und mit Hilfe des Computerprogramms *Quantity One* des ChemiDoc-Systems (BioRad) densitometrisch quantifiziert. Da sich die verschiedenen Viren in beiden Zelllinien sehr ähnlich verhielten, sind nur die Ergebnisse für A549-Zellen dargestellt (Abb. 11).



**Abb. 11 Analyse der viralen DNA-Synthese**

A549-Zellen wurden mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 20) und zu den angegebenen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet. Die virale DNA-Synthese wurde durch PCR wie unter 4.4.5.3 beschrieben bestimmt. Die aus dem Ad5 E1B-Gen amplifizierten PCR-Produkte, wurden auf einem Agarosegel analysiert, die Intensität der Banden in Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen mit dem Computerprogramm *Quantity One* des ChemiDoc (BioRad) bestimmt und graphisch dargestellt.

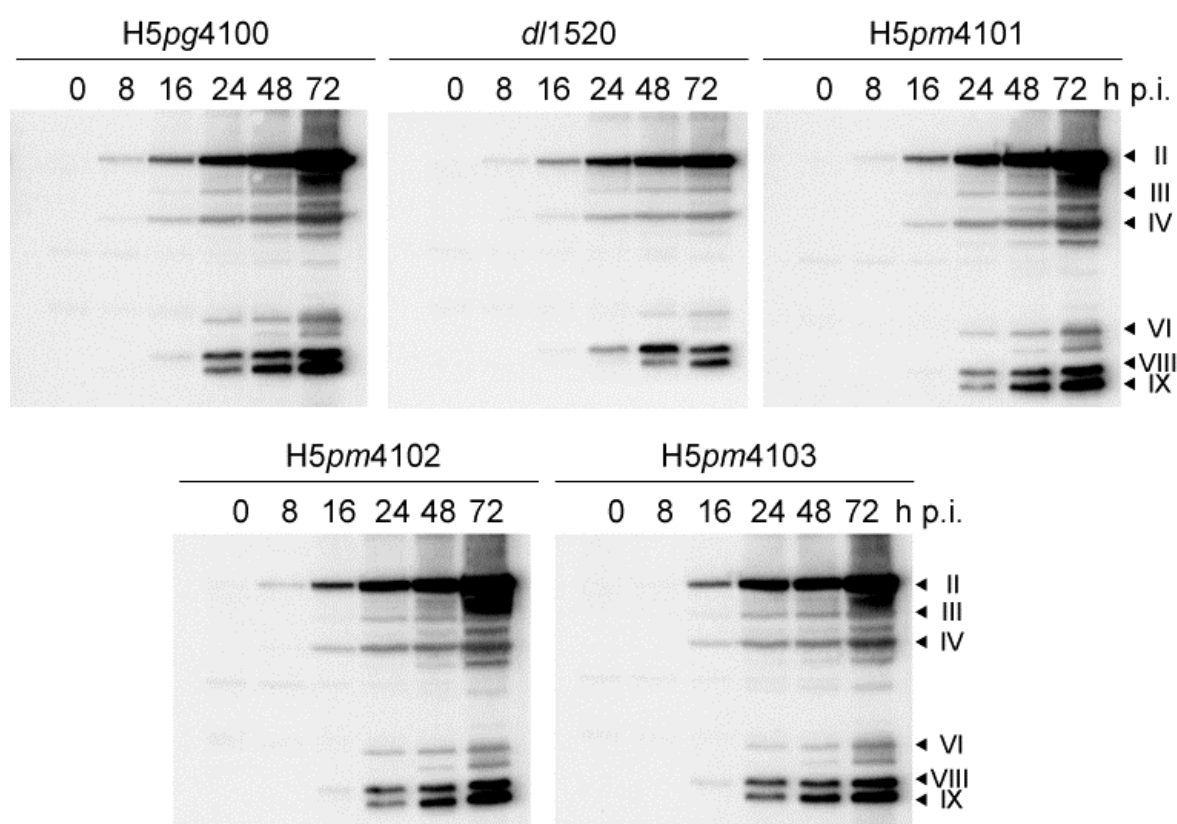
Die PCR-Analysen ergaben, dass sich der Zeitpunkt der Initiation der viralen DNA-Synthese bei den verschiedenen Virusmutanten nicht unterscheidet. Bereits 8 h p.i. konnte bei allen Virusmutanten die virale DNA nachgewiesen werden. Eine Aussage über die exakte Menge an gebildeter DNA konnte mit diesem semi-quantitativen PCR-Verfahren nicht getroffen werden. Da jedoch bei allen Viren die relative Intensität der DNA-Banden bei den entsprechenden Zeitpunkten annähernd gleich war, kann angenommen werden, dass die Mutationen keinen Einfluss auf die Effizienz der viralen DNA-Replikation haben. Dieses Ergebnis ist konsistent mit früheren Untersuchungen, bei denen ebenfalls kein Unterschied in der Replikation der viralen DNA zwischen Wildtypvirus und E1B-deletierten Viren festgestellt werden konnte (Pilder *et al.*, 1986b; Williams *et al.*, 1986; Leppard und Shenk, 1989; Goodrum und Ornelles, 1997; Goodrum und Ornelles, 1998). Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass in den getesteten Zelllinien die frühe Phase des produktiven Replikationszyklus auch ohne ein funktionelles E1B-55K-Protein erfolgreich abgeschlossen werden kann und lässt eine Funktion des Proteins vor allem in der späten Phase des Infektionszyklus vermuten.

**5.2.4 Mutationen im NES und SKM haben keinen Einfluss auf die Produktion später viraler Strukturproteine und Nachkommenviren**

Virusmutanten, denen ein funktionelles E1B-55K-Protein fehlt, zeigen schwere Defekte bei der Produktion später viraler Strukturproteine und Nachkommenviren. Dies hängt u. a. damit zusammen, dass die späten viralen mRNAs nicht mehr effizient vom Kern ins Zytoplasma transportiert werden (Babich *et al.*, 1983; Babiss und Ginsberg, 1984; Babiss *et al.*, 1985; Pilder *et al.*, 1986a; Pilder *et al.*, 1986b). Zudem können die viralen Transkripte dort nicht mehr bevorzugt an Ribosomen translatiert

werden (Beltz und Flint, 1979). Da für die Pendelaktivität des E1B-55K-Proteins sowohl das SKM als auch das NES notwendig sind, war es von Interesse, ob Mutationen in diesen Regionen die Synthese später viraler Proteine und Nachkommenviren beeinflussen.

Für die Untersuchung der viralen Strukturproteinsynthese wurden die Zelllinien HeLa und A549 mit den E1B-Virusmutanten infiziert (4.3.4) und nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet (4.2.5 und 4.6.1.1). Zum Nachweis der späten viralen Strukturproteine wurden *Western Blot*-Analysen durchgeführt (4.6.3; Abb. 12).



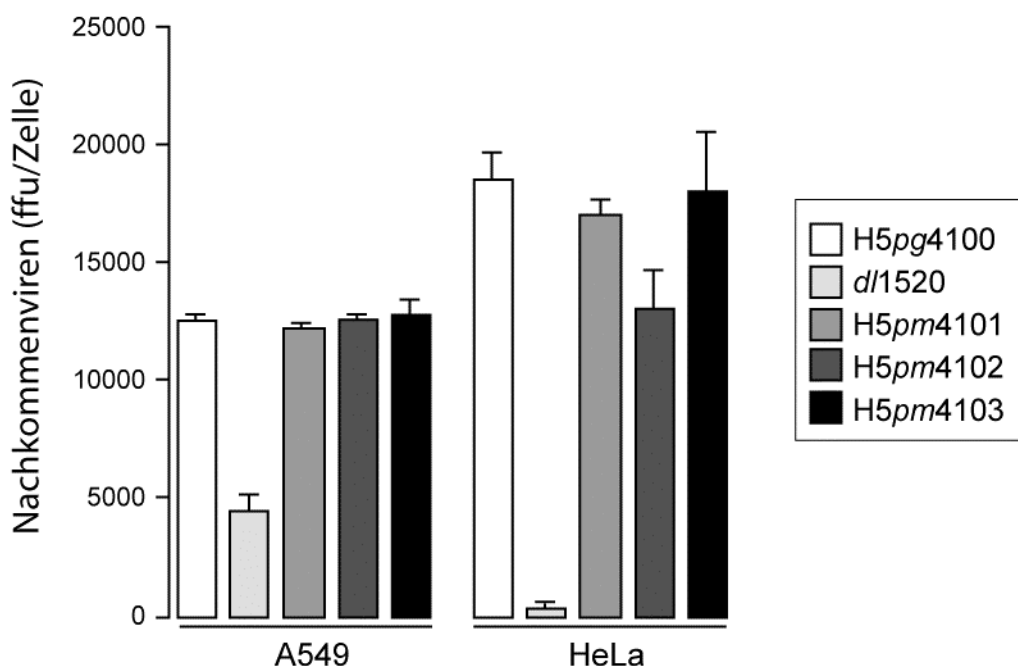
**Abb. 12 Synthese später viraler Strukturproteine**

A549-Zellen wurden mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 20) und zu den angegebenen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet. Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht infiziert (mock). Es wurden je 20 µg Gesamtzelleextrakt über 12 %ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Der Nachweis erfolgte mit dem Kaninchen-Serum *α-late*, das für verschiedene virale Kapsidproteine spezifisch ist. Die Expression einiger viraler Strukturproteine ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Die römischen Ziffern beziehen sich auf die Bezeichnung der verschiedenen Polypeptide (Maizel *et al.*, 1968). II: Hexonprotein (120 K); III: Pentonbasisprotein (85 K); IV: Fiberprotein (62 K); VI, VIII und IX: Hexon-assoziierte Proteine (26 K, 13 K und 12 K).



In A549-Zellen, in denen die Produktion später viraler Strukturproteine kaum vom E1B-55K-Protein abhängig ist, synthetisierten alle Virusmutanten bereits nach 8 h p.i. nahezu die gleiche Menge an späten Strukturproteinen. Einzig die Deletionsmutante *dl1520* zeigte einen schwachen Defekt. Auch in HeLa-Zellen verhielten sich die Virusmutanten H5pm4101, H5pm4102 und H5pm4103 ähnlich wie in A549-Zellen (Daten nicht gezeigt). Die Deletionsmutante *dl1520* jedoch wies in HeLa-Zellen einen stärkeren Defekt auf, da die Produktion später Strukturproteine in dieser Zelllinie stark vom Vorhandensein des E1B-Proteins abhängig ist. Dies korreliert mit früheren Untersuchungen in denen gezeigt wurde, dass die virale Replikation in manchen Zelllinien stark und in anderen kaum vom E1B-55K-Protein abhängig ist (Imler *et al.*, 1996; Goodrum und Ornelles, 1997; Goodrum und Ornelles, 1998; Rothmann *et al.*, 1998; Harada und Berk, 1999; Turnell *et al.*, 1999).

Auch die Produktion von Nachkommenviren hängt je nach Zelllinie unterschiedlich stark vom E1B-55K-Protein ab. Die Ausbeute an Nachkommenviren wurde deshalb in HeLa-Zellen, in denen die Virusreplikation stark und in A549-Zellen, in denen sie nur schwach vom E1B-55K-Protein abhängig ist, untersucht. Dazu wurden die Zellen mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert und wie unter 4.3.5 beschrieben, die Ausbeute an Nachkommenviren bestimmt (Abb. 13).



### **Abb. 13 Produktion von Nachkommenviren**

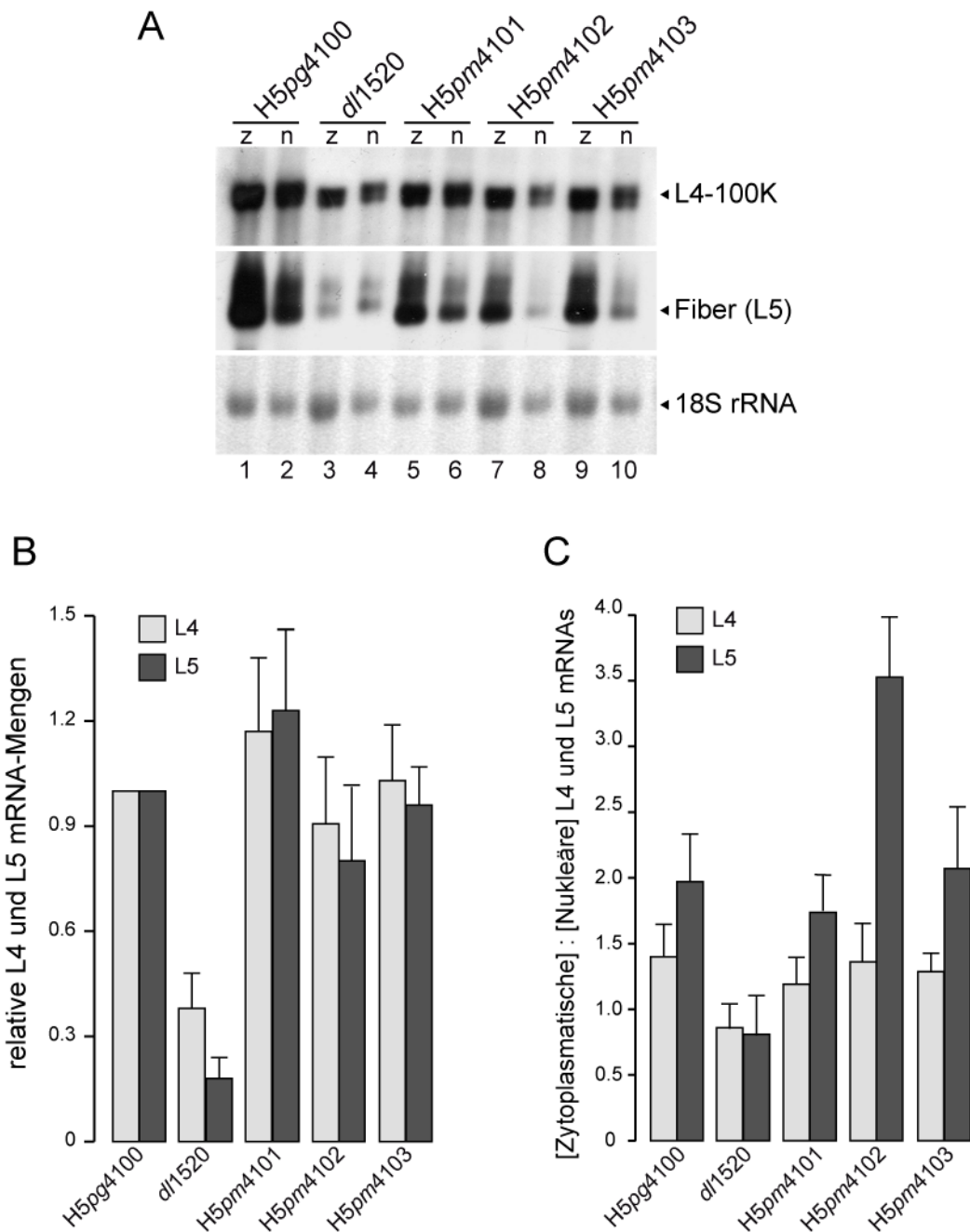
Um die Ausbeute an Nachkommenviren zu bestimmen wurden HeLa- bzw. A549-Zellen mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 10) und 72 h p.i. geerntet. Aus den infizierten Zellen wurden die Nachkommenviren isoliert und anschließend auf 911-Zellen austitriert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

Wie erwartet war die E1B-Deletionsmutante *dl1520* stark in der Produktion von Nachkommenviren eingeschränkt, wobei der Defekt in HeLa-Zellen viel stärker zum Tragen kam als in A549-Zellen. Dies deutet darauf hin, dass in A549-Zellen das Fehlen des E1B-55K-Proteins zum Teil kompensiert werden kann. In HeLa-Zellen zeigte nur die SKM-Mutante *H5<sub>pm</sub>4102* einen leichten Defekt. In A549-Zellen war die Produktion von Nachkommenviren aller Virusmutanten ähnlich zu der des Wildtypvirus.

Insgesamt zeigen diese Analysen, dass sowohl die Synthese später viraler Strukturproteine als auch die Produktion von Nachkommenviren nicht vom Vorhandensein eines funktionellen NES bzw. von der Modifikation mit SUMO1 abhängig sind. Somit haben Mutationen im NES bzw. SKM des E1B-Proteins vermutlich keinen Einfluss auf den viralen mRNA-Export.

### **5.2.5 Mutationen im SKM erhöhen die Exporteffizienz von adenoviraler L5-mRNA**

Da die Synthese später viraler Proteine und die Produktion von Nachkommenviren jedoch nur ein indirektes Maß des viralen mRNA-Exports darstellen, wurden *Northern Blot*-Analysen durchgeführt, um den Einfluss der NES- und SKM-Mutationen auf die zytoplasmatische Akkumulation viraler mRNA zu untersuchen. Dazu wurden A549-Zellen infiziert (4.3.4), nach 48 h geerntet und die RNA aus dem Zytoplasma und dem Kern isoliert (4.5.2). Die auf einer Nylonmembran fixierte RNA wurde zunächst mit Methylenblau angefärbt, um die zellulären 18S und 28S rRNAs sichtbar zu machen. Diese dienten als interne Ladekontrolle. Anschließend wurde die RNA mit Digoxigenin-markierten cRNA-Sonden gegen Fiber und L4-100K hybridisiert. Die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen wurden mit Hilfe der ImageJ-Software (Abramoff *et al.*, 2004) quantifiziert und sind in Abb. 14 dargestellt.



**Abb. 14 Northern Blot-Analyse**

(A) A549-Zellen wurden mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 10) und 48 h p.i. geerntet. Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht infiziert (mock). Es wurden je 1 µg zytoplasmatische (z) und nukleäre (n) mRNA über 1 %ige FA-Gele aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Der Nachweis der L4-RNA bzw. der Fiber (L5)-RNA erfolgte mit Digoxigenin-markierten RNA-Sonden. Die 18S rRNA-Bande wurde mit Hilfe von Methylenblaufärbung sichtbar gemacht und diente als interne Ladekontrolle. (B) Die Intensität der erhaltenen Banden der L4- bzw. der L5-RNA 48 h p.i. wurde mit der ImageJ-Software (Abramoff *et al.*, 2004) bestimmt, mit Hilfe der 18S rRNA Werte korrigiert und graphisch dargestellt, wobei der mRNA-Level des Wildtypvirus als Referenzwert auf 1 normiert wurde. (C) Das Verhältnis der Gleichgewichtsmengen zytoplasmatischer zu nukleärer mRNA diente als Maß für die Exporteffizienz der einzelnen Virusmutanten.

In Übereinstimmung mit früheren Daten (Pilder *et al.*, 1986b; Leppard und Shenk, 1989; Leppard, 1993) zeigten die *Northern Blot*-Analysen, dass die Gesamtmenge an Fiber (L5)- und L4-mRNA in der Virusmutante *dl1520* (L4 ca. 45% und L5 ca. 25% vom wt) 48 h p.i. stark verringert war (Abb. 14 A, Spuren 3 und 4; Abb. 14 B). Die Menge an L4- und L5-mRNA war in den Virusmutanten *H5pm4101* (Abb. 14 A, Spuren 5 und 6; Abb. 14 B), *H5pm4102* (Abb. 14 A, Spuren 7 und 8; Abb. 14 B) und *H5pm4103* (Abb. 14 A, Spuren 9 und 10; Abb. 14 B) etwa vergleichbar zum Wildtypvirus (Abb. 14 A, Spuren 1 und 2; Abb. 14 B). In Abb. 14 C ist das Verhältnis der Gleichgewichtsmengen zytoplasmatischer zu nukleärer mRNA dargestellt, das als Maß für die Exporteffizienz der verschiedenen Virusmutanten dient. Wie erwartet war die Virusmutante *dl1520* stark in der zytoplasmatischen Akkumulation von L4- (ca. 42 % im Vergleich zum wt) und L5-Transkripten (65 % vom wt) eingeschränkt. Die E1B-NES-Mutante, *H5pm4101* sowie die Doppelmutante *H5pm4103* exportierten späte virale mRNA ähnlich wie das Wildtypvirus. Interessanterweise führte die Mutation im SKM (*H5pm4102*) zu einer im Vergleich zum Wildtypvirus doppelt so hohen zytoplasmatischen Akkumulation von L5-Transkripten. Die L4-mRNA war davon jedoch nicht betroffen. Konsistent mit früheren Daten deutet dies darauf hin, dass der Export von L5-mRNA stärker von E1B-55K abhängig ist als der Export von L4-mRNA (Pilder *et al.*, 1986a; Pilder *et al.*, 1986b; Leppard und Shenk, 1989; Gonzalez und Flint, 2002).

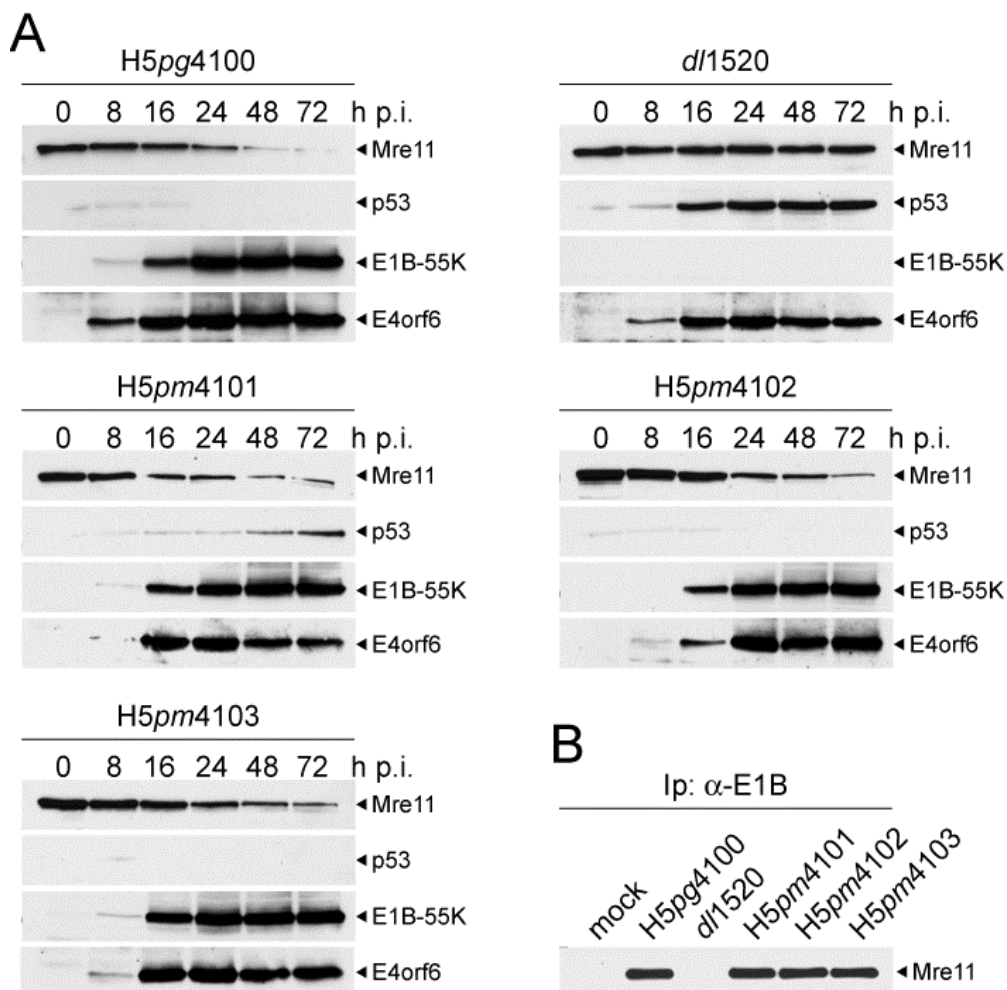
### **5.2.6 Mutationen im NES von E1B führen zu einem verminderten Abbau von p53, nicht aber von Mre11 in infizierten Zellen**

Eine weitere wichtige Funktion des E1B-55K-Proteins ist die Verringerung der Halbwertszeit des zellulären Tumorsuppressors p53 in Kooperation mit E4orf6. In Wildtypvirus-infizierten Zellen, in denen sowohl das E1B-55K- als auch das E4orf6-Protein exprimiert werden, nimmt die Menge an p53 deutlich ab, wohingegen in Abwesenheit eines dieser beiden viralen Proteine der Tumorsuppressor akkumuliert (Grand *et al.*, 1994; Querido *et al.*, 1997; Ridgway *et al.*, 1997; Steegenga *et al.*, 1998). Das E1B-55K-Protein bildet zusammen mit E4orf6 und einer Reihe weiterer zellulärer

Proteine eine SCF-ähnliche E3-Ubiquitin-Ligase (Cullin-5, Rbx1/RCO1/Hrt1, Elongin B und C), deren Funktion die Ubiquitinylierung von Proteinen ist (Querido *et al.*, 2001a; Harada *et al.*, 2002; Blanchette *et al.*, 2004).

Neben p53 konnte auch das zelluläre Mre11-Protein als Interaktionspartner von E1B-55K identifiziert werden, das ebenfalls Proteasomen-abhängig abgebaut wird. Nicht inhibiert würde die Aktivität des MRN (Mre11/Rad50/Nbs1)-Komplexes zur Konkaterisierung der doppelsträngigen viralen DNA-Genome führen (Stracker *et al.*, 2002).

Um zu testen, ob die AS-Austausche der Virusmutanten H5pm4101, H5pm4102 und H5pm4103 einen Einfluss auf die Degradation von p53 und Mre11 haben, wurden A549-Zellen infiziert (4.3.4), nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und aufgeschlossen (4.2.5 und 4.6.1.1). Zum Nachweis des Abbaus von p53 und Mre11 wurden *Western Blot*-Analysen durchgeführt (4.6.3; Abb. 15).



**Abb. 15 Degradation von p53 und Mre11 und Bindung von E1B an Mre11 in Adenovirus-infizierten Zellen**

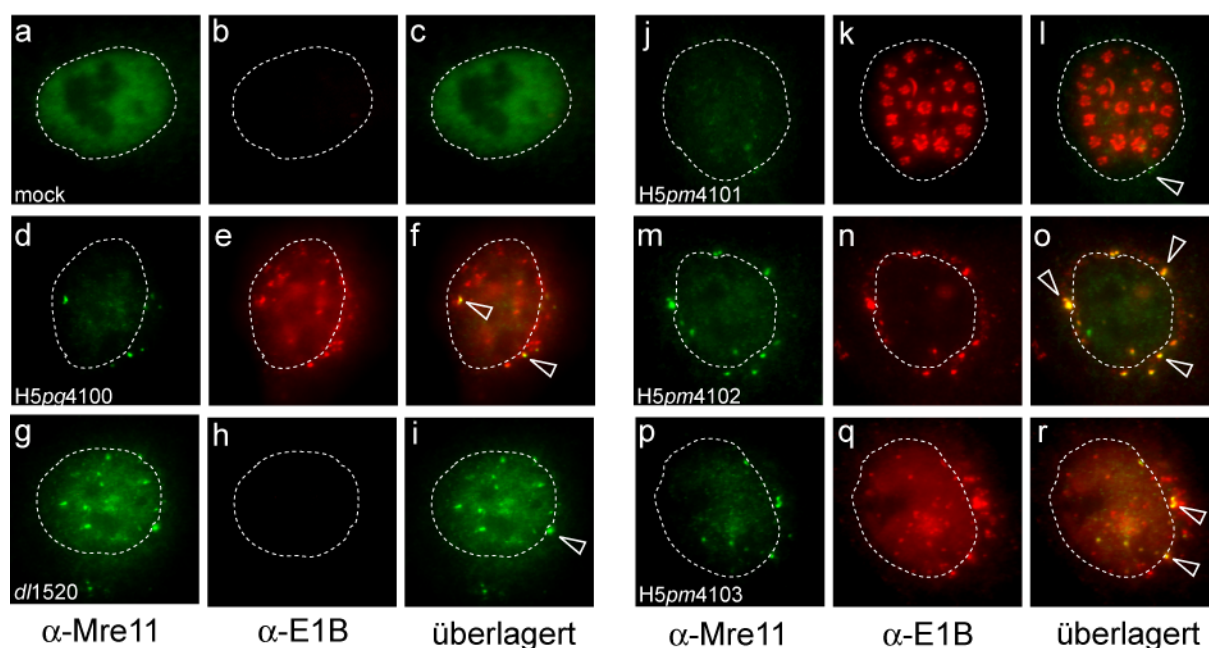
(A) Subkonfluente A549-Zellen wurden mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 20) und zu den angegebenen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet. Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht infiziert (mock). Es wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (100 µg für Mre11, p53 und E4orf6; 50 µg für E1B) über 12 %ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt, auf Nitrozellulose mittels *Western Blot* transferiert und mit den Antikörpern gegen Mre11, p53 (DO-1), E1B (2A6) und E4orf6 (RSA3) inkubiert. (B) A549-Zellen wurden mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 20) und 24 h p.i. geerntet. Zur Koimmunpräzipitation wurden 2 mg Zellysate mit dem E1B-Antikörper 2A6 immunpräzipitiert und über 10 %ige SDS-Gele aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mittels *Western Blot* auf Nitrozellulose transferiert und mit dem Antikörper gegen Mre11 inkubiert.

In A549-Zellen, die mit der Virusmutante *dl1520* infiziert wurden, kommt es wie erwartet zu einer starken Akkumulation von p53, da das Tumorsuppressorprotein ohne E1B-55K nicht dem proteolytischen Abbau zugeführt werden kann. In Wildtypvirus-infizierten Zellen hingegen wird das p53-Protein vollständig abgebaut. Dasselbe kann man auch bei den Virusmutanten *H5pm4102* und *H5pm4103* beobachten. Im Gegensatz dazu kann in *H5pm4101*-infizierten A549-Zellen noch deutlich p53 detektiert werden. Der verminderte Abbau kann nicht auf eine verringerte E1B-55K- oder E4orf6-Menge zurückgeführt werden. Dies deutet darauf hin, dass der Abbau von p53 zumindest teilweise vom Vorhandensein eines funktionellen NES abhängig sein könnte.

Konsistent zum Abbau von p53, waren Zellen, die mit der E1B-Deletionsmutante *dl1520* infiziert wurden, nicht in der Lage Mre11 dem proteasomalen Abbau zuzuführen. In Wildtypvirus-infizierten Zellen begann die Degradation von Mre11 ca. 24 h p.i., ähnlich verhielten sich Zellen die mit der Virusmutante *H5pm4101* infiziert wurden. Im Gegensatz dazu war der Abbau in den Virusmutanten *H5pm4102* und *H5pm4103* etwas verzögert. Diese verzögerte Degradation kann jedoch nicht auf eine verminderte Bindung der E1B-Mutanten mit dem Mre11-Protein zurückgeführt werden (Abb. 15 B). Zusammen weist dies auf eine Beteiligung des NES im E1B-55K-Protein beim Abbau von p53, nicht aber von Mre11 hin.

Neueste Untersuchungen zeigen, dass der Abbau von Mre11 vermutlich mit dessen Umlokalisierung in zytoplasmatische Aggresome in Zusammenhang steht (Liu *et al.*, 2005). Dabei spielt wahrscheinlich das frühe E4orf3-Protein eine wichtige Rolle

(Araujo *et al.*, 2005). Zudem zeigen die Daten von Liu und Mitarbeitern, dass die Zugabe von Leptomycin B (LMB), einem Inhibitor des CRM1-vermittelten Exports, zu einem verringerten Mre11-Abbau führt (Liu *et al.*, 2005). Deshalb sollte getestet werden, ob die Mutationen im NES und SKM einen Einfluss auf die Lokalisation von Mre11 in zytoplasmatischen Aggresomen haben (Abb. 16).



**Abb. 16 Immunfluoreszenzanalysen zur Kolokalisation von E1B-55K und Mre11**

A549-Zellen wurden auf Objektträger ausgesät und bei einer Konfluenz von 60 % mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 20). Die Zellen wurden 20 h p.i. mit PFA fixiert und *in situ* mit dem anti-E1B-55K-Antikörper 2A6 aus Maus und dem anti-Mre11-Antikörper aus Kaninchen doppelmarkiert. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte mit einem *Texas Red*-gekoppelten anti-Maus-Antikörper und einem FITC-gekoppelten anti-Kaninchen-Antikörper. Überlagerungen der Lokalisationen von Mre11 (grün; a, d, g, j, m, p) und E1B-55K (rot; b, e, h, k, n, q) sind in c, f, i, l, o und r dargestellt. Die gestrichelten Linien in den Bildern geben jeweils die Lage und Größe des Zellkerns an.

Tatsächlich konnte in fast allen Virusmutanten Kolokalisation von Mre11 und E1B in zytoplasmatischen Aggregaten nachgewiesen werden (Abb. 16 f, i, l, o, r). Da auch in der Deletionsmutante *dl1520* Mre11 in einer zytoplasmatischen Struktur detektiert werden konnte, ist die Lokalisation von Mre11 in virusinfizierten Zellen vermutlich unabhängig von E1B-55K. Dies ist konsistent mit Untersuchungen von Araujo und Mitarbeitern, die zeigten, dass E4orf3 eine wichtige Rolle bei der Umlokalisierung von Mre11 ins Zytoplasma spielt (Araujo *et al.*, 2005). Auffallend ist jedoch, dass in der

E1B-NES-Mutante H5pm4101 die zytoplasmatischen Aggregate mit Mre11 fast vollständig fehlen (Abb. 16 j - l). Ein ähnliches Ergebnis erhält man, wenn man die Lokalisation von Mre11 in E1A + E1B-transformierten Rattenzellen nach LMB-Behandlung bzw. in E1A + E1B-NES-transformierten Rattenzellen untersucht (Härtl, 2005). Da die E1B-NES-Mutante wie das Wildtypprotein an Mre11 bindet (Abb. 15 B), lässt dies vermuten, dass durch die Inhibition der CRM1-abhängigen Exportfunktion von E1B-55K, Mre11 verstärkt im Kern zurückgehalten wird. Da jedoch auch die E1B-NES-Virusmutante Mre11 abbauen kann, scheint die zytoplasmatische Lokalisation von Mre11 nicht mit seinem Abbau in Verbindung zu stehen.

Zusammenfassend zeigen die bisher durchgeführten Analysen, dass das E1B-Protein auch in virusinfizierten Zellen zwischen Zellkern und Zytoplasma pendelt. Mutationen im NES bzw. SKM des E1B-55K-Proteins führen zwar zu einer veränderten Lokalisation der mutierten E1B-Proteine, dennoch weisen die Virusmutanten keinen deutlichen Defekt in Bezug auf virale DNA-Replikation (Abb. 11), mRNA-Transport (Abb. 14), späte virale Strukturproteinsynthese (Abb. 12) und Produktion von Nachkommenviren (Abb. 13) auf. Daher könnte es sein, dass ein oder auch mehrere andere virale Proteine die Mutationen des E1B-55K-Proteins kompensieren. Ein möglicher Kandidat wäre das multifunktionelle E4orf6-Protein, das ebenfalls ein CRM1-abhängiges NES enthält und zudem an E1B-55K binden kann. Deshalb sollten im nächsten Schritt dieser Arbeit Virusmutanten hergestellt werden, die Mutationen sowohl im NES des E4orf6-Proteins als auch in den NES von beiden Proteinen (E1B-55K und E4orf6) enthalten.



### 5.3 Charakterisierung der Virusmutanten H5pm4101, H5pm4116 und H5pm4119

Das E4orf6-Protein ist wie das E1B-55K-Protein für die Expression später viraler Gene, für das Abschalten der zellulären Proteinsynthese, sowie für die Produktion von Nachkommenviren wichtig (Halbert *et al.*, 1985; Weinberg und Ketner, 1986; Huang und Hearing, 1989; Bridge und Ketner, 1990). Virusmutanten, die kein funktionelles E4orf6-Protein exprimieren, weisen deshalb einen ähnlichen Phänotyp wie E1B-deletierte Viren auf (Halbert *et al.*, 1985; Sandler und Ketner, 1989). Zudem erhöht das E4orf6-Protein die Stabilität der späten viralen mRNAs im Zellkern (Ketner *et al.*, 1989; Sandler und Ketner, 1991) und bewirkt im Komplex mit dem E1B-55K-Protein den selektiven Export viraler mRNAs ins Zytoplasma, während zelluläre Transkripte im Zellkern zurückgehalten werden (Babiss und Ginsberg, 1984; Babiss *et al.*, 1985; Halbert *et al.*, 1985; Pilder *et al.*, 1986a; Pilder *et al.*, 1986b; Cutt *et al.*, 1987; Huang und Hearing, 1989; Bridge und Ketner, 1990). Das E4orf6-Protein besitzt wie E1B-55K ein NES und zusätzlich ein nukleäres Lokalisations-signal, die den Kernexport bzw. -import des E4orf6-Proteins vermitteln (Dobbelstein *et al.*, 1997). Es gibt jedoch widersprüchliche Aussagen über die Funktionalität des E4orf6-NES (Dobbelstein *et al.*, 1997; Krätzer *et al.*, 2000; Weigel und Dobbelstein, 2000). Mit Hilfe von kombinierten Transfektions-/Infektionsversuchen konnte gezeigt werden, dass Mutationen im E4orf6-NES zu einer verminderten Produktion von Hexonproteinen und viralen Nachkommen führen (Weigel und Dobbelstein, 2000). Bridge und Mitarbeiter konnten unter ähnlichen Versuchsbedingungen jedoch keinen Einfluss auf die späte virale Proteinsynthese feststellen (Rabino *et al.*, 2000). Diese diskrepanten Ergebnisse zeigen, dass die Komplementationsanalysen keinen eindeutigen Beweis für die Funktion des E4orf6-NES-Proteins liefern konnten. Deshalb war es von großem Interesse, Virusmutanten herzustellen, um die Funktionen des E4orf6-NES bei der viralen Replikation im Kontext der Virusinfektion zu untersuchen. Die bisher durchgeführten Experimente wurden infolgedessen mit Virusmutanten, bei denen entweder nur das NES des E4orf6-Proteins (H5pm4116) oder die NES von E4orf6 und E1B-55K (H5pm4119) mutiert sind, wiederholt.

### 5.3.1 Herstellung von Ad5 E4orf6-Mutanten

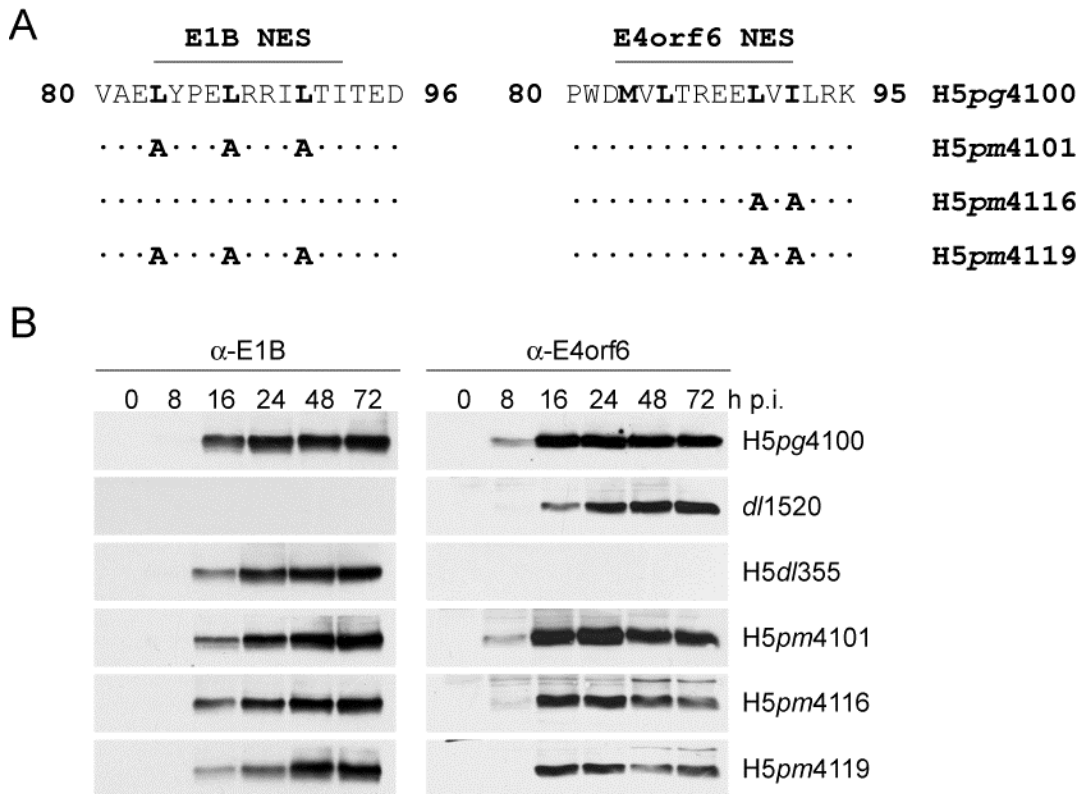
Die Herstellung von Virusmutanten, die Punktmutationen im E4orf6-Gen tragen, erfolgte analog zur Herstellung E1B-mutierter Ad5 Mutanten (Abb. 4). Dazu wurde aus dem Ad5-Bacmid der Bereich subkloniert, der die E4-Region von Ad5 und den bakteriellen Vektoranteil enthielt (pE4-1155 bzw. E4-Box). In die Sequenz der E4-Region wurde dann die gewünschte Mutation in das NES mit Hilfe des *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits* (Stratagene) eingeführt. Als nächstes erfolgte die Rückklonierung der modifizierten E4-Box in das Ad5-Bacmid pH5pg4100 bzw. zur Herstellung der E1B/E4orf6-NES-Doppelmutante in das Ad5-E1B-NES-Bacmid (pH5pm4101). Im Anschluss wurde das Bacmid mit *PacI* linearisiert und somit der bakterielle und der virale Anteil getrennt. Nach Transfektion der doppelsträngigen Virus-DNA in die E4orf6-komplementierende Helfierzelllinie H1299S wurden die Virusmutanten wie unter 4.3.1 beschrieben geerntet.

Das NES im E4orf6-Protein wurde inaktiviert, indem die AS Leucin und Isoleucin an den Positionen 90 bzw. 92 durch Alanine ersetzt wurden (H5pm4116). Zudem wurde eine Doppelmutante hergestellt, die sowohl die Punktmutationen im NES des E1B-Proteins als auch im NES des E4orf6-Proteins enthält (H5pm4119). Als weitere Virusmutante wurde, neben *dl1520*, die E4orf6-Deletionsmutante H5*dl355* (Halbert *et al.*, 1985) verwendet. H5pg4100 diente wiederum als Ad5 Wildtypvirus (Abb. 17 A).

### 5.3.2 Mutationen im NES von E4orf6 führen zu einer verringerten E4orf6-Gleichgewichtsmenge im Verlauf der Virusinfektion

Zunächst wurde untersucht, wie sich die Mutationen auf die Gleichgewichtsmengen von E4orf6 und E1B-55K im zeitlichen Verlauf der Infektion auswirken. Dazu wurden wiederum die Zelllinien A549 und HeLa wie unter 4.3.4 beschrieben infiziert, nach verschiedenen Zeiten geerntet (4.6.1.1) und mit Hilfe von *Western Blot*-Analysen untersucht. Da die Ergebnisse beider Zelllinien nahezu identisch waren, wurden nur die Resultate für A549-Zellen dargestellt (Abb. 17 B).

## ERGEBNISSE



**Abb. 17 Effekt der NES-Mutationen auf die Gleichgewichtsmengen der E1B-55K- und E4orf6-Proteine**

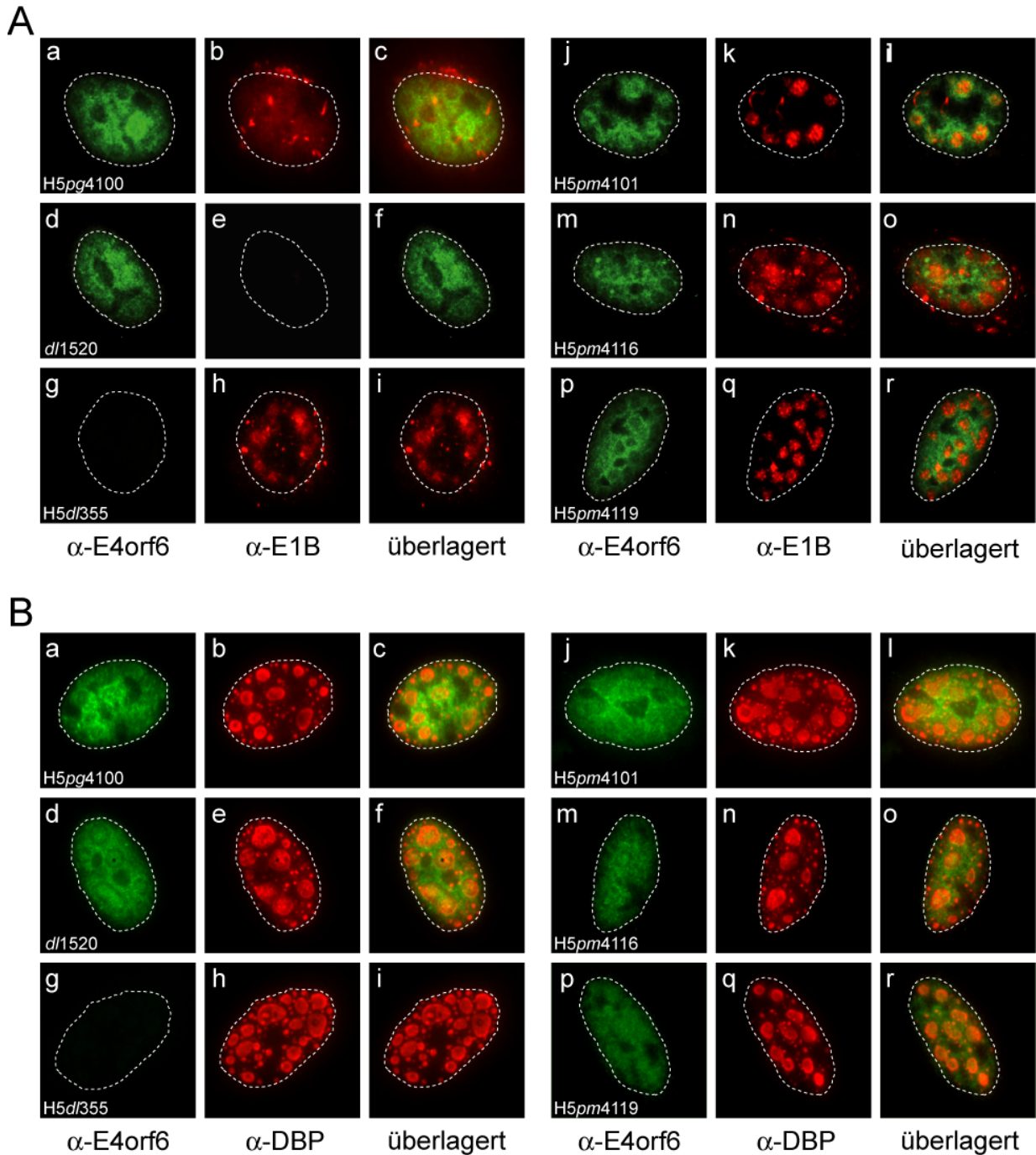
(A) Dargestellt sind Sequenzausschnitte des NES von Ad5 E1B-55K und Ad5 E4orf6, die jeweils mit der angegebenen AS-Position beginnen. Die AS-Austausche im Leucin-reichen NES des E1B-55K-Proteins (AS-Reste 83 - 93) und des E4orf6-Proteins (AS-Reste 83 - 92) sind im Wildtypvirus (H5pg4100) und den Virusmutanten E1B-NES (H5pm4101), E4orf6-NES (H5pm4116) und Doppel-NES (H5pm4119) markiert. Punkte kennzeichnen jeweils gleiche AS. (B) A549-Zellen wurde mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 20) und zu den angegebenen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet. Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht infiziert (mock). Es wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (20 µg für E1B und 100 µg für E4orf6) über 12 %ige SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mittels *Western Blot* auf Nitrozellulose transferiert. Der Nachweis erfolgte mit dem E1B-55K-spezifischen Maus-Antikörper 2A6 bzw. mit dem E4orf6-spezifischen Maus-Antikörper RSA3.

Mit Ausnahme von *dl1520* zeigen die verschiedenen Virusmutanten im Vergleich zum Wildtypvirus H5pg4100 keine signifikanten Unterschiede bei der Expression des E1B-55K-Proteins (Abb. 17 B). Die Gleichgewichtsmenge von E4orf6 war jedoch bei den E4orf6-NES-Mutanten H5pm4116 und H5pm4119 reduziert. Dies deutet darauf hin, dass die Mutationen im NES des E4orf6-Proteins zu einer verringerten Stabilität des viralen Proteins führen. Da auch in der E1B-Deletionsmutante *dl1520* geringere E4orf6-Mengen detektierbar sind, scheint es, als ob E1B-55K einen positiven Effekt auf die Stabilität bzw. Expression von E4orf6 hat.

### **5.3.3 Mutationen im NES von E4orf6 verändern die subzelluläre Lokalisation von E1B-55K in infizierten Zellen**

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der AS-Austausche auf die subzelluläre Verteilung von E1B-55K und E4orf6 in infizierten Zellen untersucht. Frühere Untersuchungen zeigten, dass das E4orf6-Protein in virusinfizierten Zellen im Zellkern lokalisiert ist, wobei die Bereiche der Nukleoli ausgeschlossen sind. Darüber hinaus wird angenommen, dass das E4orf6-Protein wichtig für die Rekrutierung des E1B-55K-Proteins zu den viralen Replikations- und Transkriptionszentren ist (Ornelles und Shenk, 1991).

Um die Auswirkungen der NES-Mutationen auf die Lokalisation von E4orf6 und E1B-55K zu testen, wurden Immunfluoreszenzanalysen (4.6.6) in infizierten A549-Zellen 20 h p.i. durchgeführt (Abb. 18).



**Abb. 18 Immunfluoreszenzanalysen zur Kolokalisation von E4orf6 und E1B-55K bzw. von E4orf6 und DBP**

A549-Zellen wurden auf Objektträger ausgesät, bei einer Konfluenz von 60 % mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 20) und 20 h p.i. mit PFA fixiert. (A) Die Zellen wurden *in situ* mit dem anti-E4orf6-Antikörper 1807 aus Kaninchen und dem anti-E1B-55K-Antikörper 2A6 aus Maus doppelmarkiert. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte mit einem FITC-gekoppelten anti-Kaninchen-Antikörper und einem *Texas Red*-gekoppelten anti-Maus-Antikörper. Überlagerungen der Lokalisationen von E4orf6 (grün; a, d, g, j, m, p) und E1B-55K (rot; b, e, h, k, n, q) sind in c, f, i, l, o und r dargestellt. (B) Die Zellen wurden *in situ* mit dem anti-E4orf6-Antikörper 1807 aus Kaninchen und dem anti-DBP-Antikörper B6-8 aus Maus doppelmarkiert. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte mit einem FITC-gekoppelten anti-Kaninchen-Antikörper und einem *Texas Red*-gekoppelten anti-Maus-Antikörper. Überlagerungen der Lokalisationen von E4orf6 (grün; a, d, g, j, m, p) und DBP

(rot; b, e, h, k, n, q) sind in c, f, i, l, o und r dargestellt. Die gestrichelten Linien in den Bildern geben jeweils die Lage und Größe des Zellkerns an.

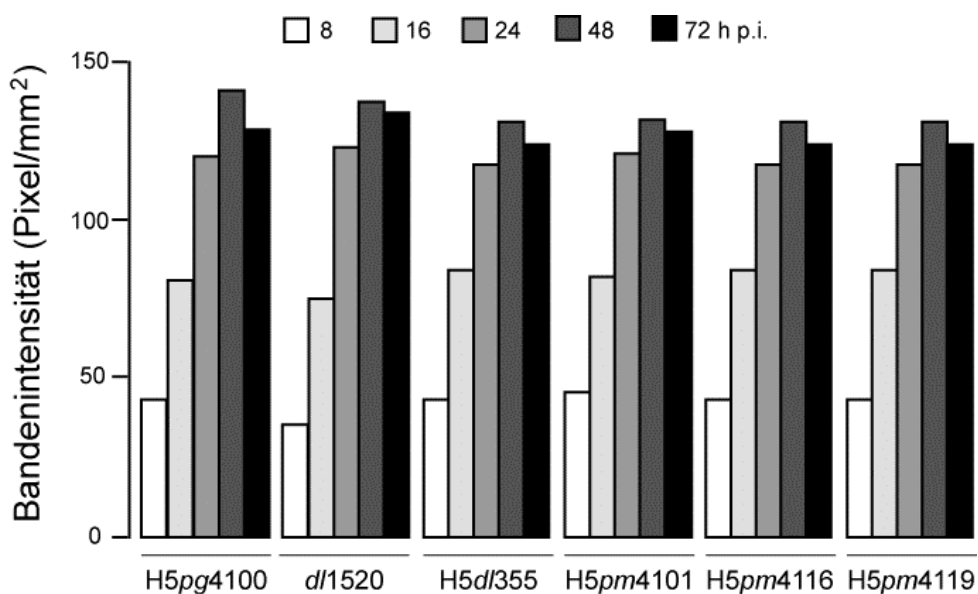
Das E4orf6-Protein war bei allen Virusmutanten im Zellkern lokalisiert, wobei zum Teil einzelne ringförmige Bereiche eine schwächere Färbung aufwiesen (Abb. 18 A und B; a, d, g, j, m und p). In den H5pm4116- und H5pm4119-infizierten Zellen war, wie schon in den *Western Blot*-Untersuchungen, weniger E4orf6 detektierbar als im Wildtypvirus (Abb. 18 A und B; m und p). Das E1B-55K-Protein war in Wildtypvirus H5pg4100-infizierten Zellen wiederum sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern diffus verteilt, zusammen mit mehreren kleinen, meist punktförmigen Strukturen in der Nähe des Zellkerns (Abb. 18 A; b). In der E1B-NES-Mutante H5pm4101 aggregierte E1B-55K wie bereits erwähnt an der Peripherie der viralen Replikations- und Transkriptionszentren (Abb. 18 A; k). Auch in der Doppel-NES-Virusmutante H5pm4119 lokalisierte das E1B-Protein an diesen nukleären Strukturen (Abb. 18 A; q). Überraschenderweise war E1B-55K auch in E4orf6-NES-infizierten (H5pm4116) Zellen (Abb. 18 A; n) stärker an den viralen Replikationszentren konzentriert als in Wildtypvirus-infizierten Zellen. Zusätzlich zeigte das E1B-Protein in diesen Zellen noch eine diffuse zytoplasmatische Färbung mit einigen kleineren Aggregaten. Ähnlich sieht das Verteilungsmuster in der E4orf6-Deletionsmutante H5dl355 aus (Abb. 18 A; h). Dies deutet darauf hin, dass die Mutation des NES im E4orf6-Protein bzw. die Abwesenheit von E4orf6 zu einer verstärkten Akkumulation des E1B-Proteins an den viralen Replikationszentren führt. Da eine verringerte E4orf6-Menge (Lethbridge *et al.*, 2003), genauso wie die Mutation des E1B-NES zu einer erhöhten SUMOylierung des E1B-55K-Proteins führt (Abb. 6 B, Spur 10), könnte die veränderte Lokalisation von E1B-55K auch mit dessen SUMO1-Modifikation in Zusammenhang stehen.

Zusätzlich wurde die Kolokalisation von E4orf6 und DBP untersucht. Die Immunfluoreszenzanalysen zeigten, dass man aufgrund der ähnlichen Lokalisation und Expression von DBP in allen Virusmutanten auf einen vergleichbaren Verlauf der Infektionen in der frühen Phase schließen kann. Es konnte jedoch bei keiner der untersuchten Virusmutanten eine eindeutige Kolokalisation zwischen E4orf6 und

DBP festgestellt werden (Abb. 18 B).

### 5.3.4 Die Inhibition des CRM1-abhängigen nukleären Exports von E1B und E4orf6 hat keinen Einfluss auf die virale DNA-Synthese

Frühere Untersuchungen ergaben, dass Adenoviren, denen die frühen Proteine E4orf3 und E4orf6 fehlen, einen verzögerten Beginn bei der Synthese viraler DNA zeigen (Weinberg und Ketner, 1986; Yoder und Berget, 1986; Huang und Hearing, 1989; Bridge *et al.*, 1993b). Im Folgenden wurde überprüft, ob die Mutationen im E4orf6-NES einen Einfluss auf die Initiation der viralen DNA-Replikation haben. Dazu wurden die Zelllinien A549 und HeLa mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (4.3.4), nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und aufgeschlossen (4.2.5 und 4.6.1.1). Die PCR-Reaktion wurde wie unter 4.4.5.3 beschrieben durchgeführt. Die Reaktionsprodukte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert und mit Hilfe des Computerprogramms *Quantity One* des ChemiDoc-Systems (BioRad) densitometrisch quantifiziert. Da sich die verschiedenen Viren in beiden Zelllinien sehr ähnlich verhielten, wurden nur die, bei der Untersuchung der A549-Zellen erhaltenen Ergebnisse dargestellt (Abb. 19).



**Abb. 19 Analyse der viralen DNA-Synthese**

A549-Zellen wurden mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 20) und zu den angegebenen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet. Die virale DNA-Synthese wurde durch PCR wie unter

4.4.5.3 beschrieben bestimmt. Die aus dem Ad5 E1B-Gen amplifizierten PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel analysiert, die Intensität der Banden in Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen mit dem Computerprogramm *Quantity One* des ChemiDoc (BioRad) bestimmt und graphisch dargestellt.

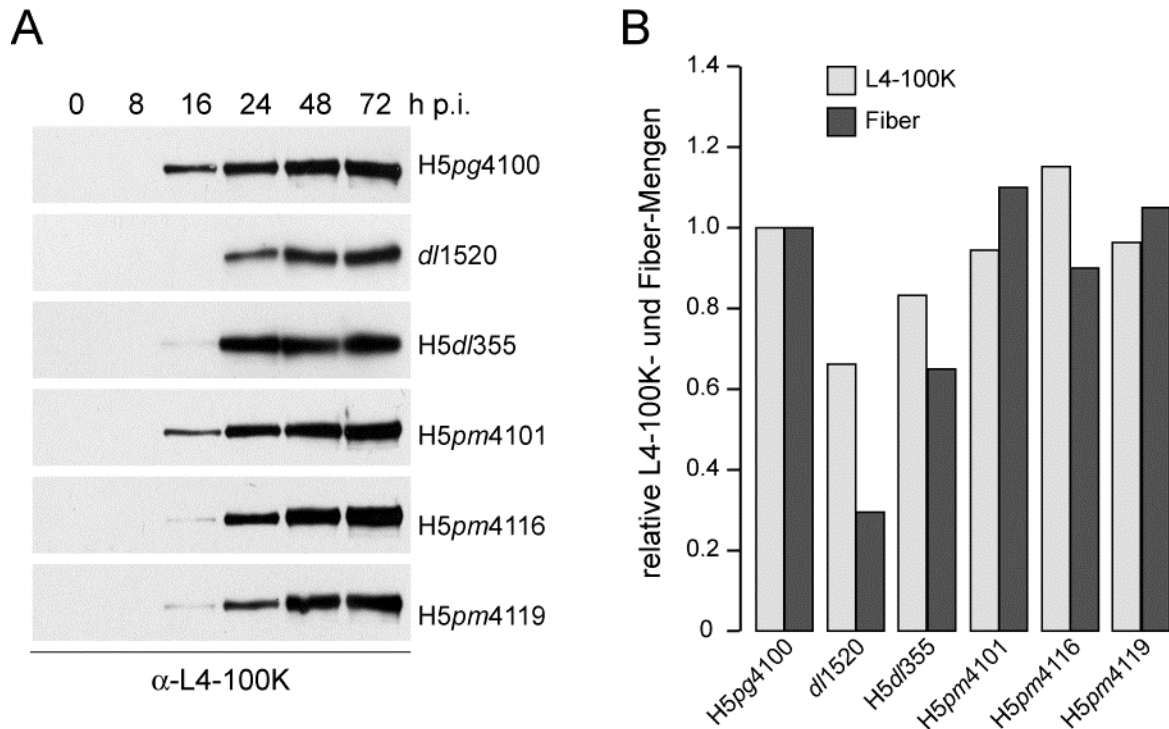
Analog zur Analyse der viralen DNA der NES- und SKM-Virusmutanten (Abb. 11) konnte kein Defekt bei den hier untersuchten Virusmutanten festgestellt werden. Auch die E4orf6-Deletionsmutante H5dl355 zeigte keinen verzögerten Beginn der viralen DNA-Synthese.

### **5.3.5 Mutationen im E4orf6-NES führen zu einer verzögerten viralen Strukturproteinsynthese und verminderten Produktion an Nachkommenviren**

Die adenoviralen Proteine E4orf6 und E1B-55K bilden in virusinfizierten Zellen einen Komplex, der vermutlich für den selektiven Export viraler mRNAs ins Zytoplasma verantwortlich ist, während zelluläre Transkripte im Zellkern zurückgehalten werden (Sarnow *et al.*, 1984; Babiss *et al.*, 1985; Halbert *et al.*, 1985; Pilder *et al.*, 1986b; Cutt *et al.*, 1987; Huang und Hearing, 1989; Bridge und Ketner, 1990). Virusmutanten, denen ein funktionelles E1B-55K- bzw. E4orf6- Protein fehlt, zeigen deshalb schwere Defekte bei der Produktion später viraler Strukturproteine und Nachkommenviren. Da sowohl E4orf6 als auch E1B ein Leucin-reiches NES enthalten, war es von Interesse, ob die CRM1-abhängige Exportfunktion von E1B und E4orf6 wichtig für die Synthese später viraler Proteine ist.

Dazu wurden die Zelllinien HeLa und A549 mit den E1B-Virusmutanten infiziert (4.3.4) und nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet (4.2.5 und 4.6.1.1). Zum Nachweis der späten Proteine wurden *Western Blot*-Analysen durchgeführt (4.6.3). In Abb. 20 ist das späte L4-100K-Protein, sowie die Quantifizierung der Bandenstärke 48 h p.i. des L4-100K- als auch des Fiber-Proteins (L5) in infizierten A549-Zellen dargestellt.





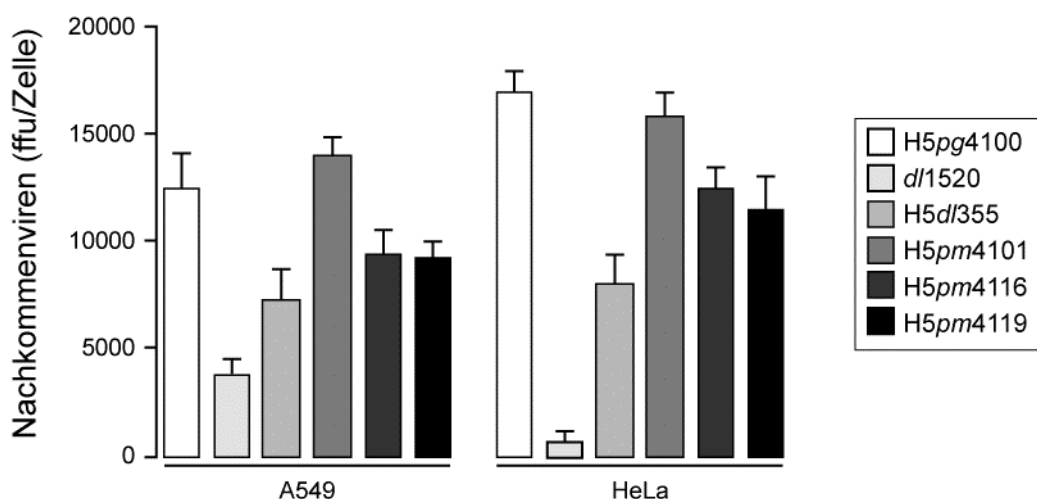
**Abb. 20 Western Blot und Quantifizierung der Synthese später viraler Proteine**

(A) A549-Zellen wurden mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 20) und zu den angegebenen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet. Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht infiziert (mock). Es wurden je 20  $\mu$ g Gesamtzellextrakt über 12 %ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Der Nachweis des L4-100K-Proteins der MLTU erfolgte mit dem Ratten-Antikörper 6B10. (B) Die Intensität der erhaltenen Banden des L4-100K- (A) bzw. des Fiber-Proteins (*Western Blot* nicht gezeigt) 48 h p.i. wurde mit Hilfe der ImageJ-Software (Abramoff *et al.*, 2004) bestimmt und graphisch dargestellt.

Die *Western Blot*-Analysen zeigen, dass sowohl die Synthese des L4-100K-Proteins (Abb. 20 A) als auch die des Fiber-Proteins (Daten nicht gezeigt) in den E1B- bzw. E4orf6-Deletionsmutanten *dl1520* und *H5dl355* verzögert beginnt. Ähnliche Resultate erhält man auch bei den Virusmutanten *H5pm4116* und *H5pm4119*. Dies deutet darauf hin, dass die Mutation des NES im E4orf6-Protein zu einer im Vergleich zum Wildtypvirus verzögerten Expression später viraler Proteine führt. Es könnte jedoch auch sein, dass dieser Defekt in Zusammenhang mit den verringerten Gleichgewichtsmengen der E4orf6-NES-Proteine (Abb. 17 B) steht. Die Quantifizierung (Abb. 20 B) ergab, dass 48 h p.i. die Menge des Fiber-Proteins in *dl1520*-infizierten Zellen stark vermindert ist, wohingegen die L4-100K-Menge nur eine leichte Reduktion im Vergleich zu wt-infizierten Zellen zeigt. In *H5dl355*-infizierten Zellen war der Defekt insgesamt nicht so deutlich. Trotz der verspäteten Produktion waren

die Gleichgewichtsmengen von Fiber und L4-100K der E4orf6-NES-Mutante H5pm4116 und der Doppel-NES H5pm4119 48 h p.i. vergleichbar zu denen des Wildtypvirus H5pg4100.

Da die Produktion von Nachkommenviren von der verwendeten Zelllinie abhängig ist (Imler *et al.*, 1996; Goodrum und Ornelles, 1997; Goodrum und Ornelles, 1998; Rothmann *et al.*, 1998; Harada und Berk, 1999; Turnell *et al.*, 1999), wurde die Ausbeute an Nachkommenviren wiederum in HeLa- und in A549-Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert und wie unter 4.3.5 beschrieben, die Zahl der Nachkommenviren bestimmt (Abb. 21).



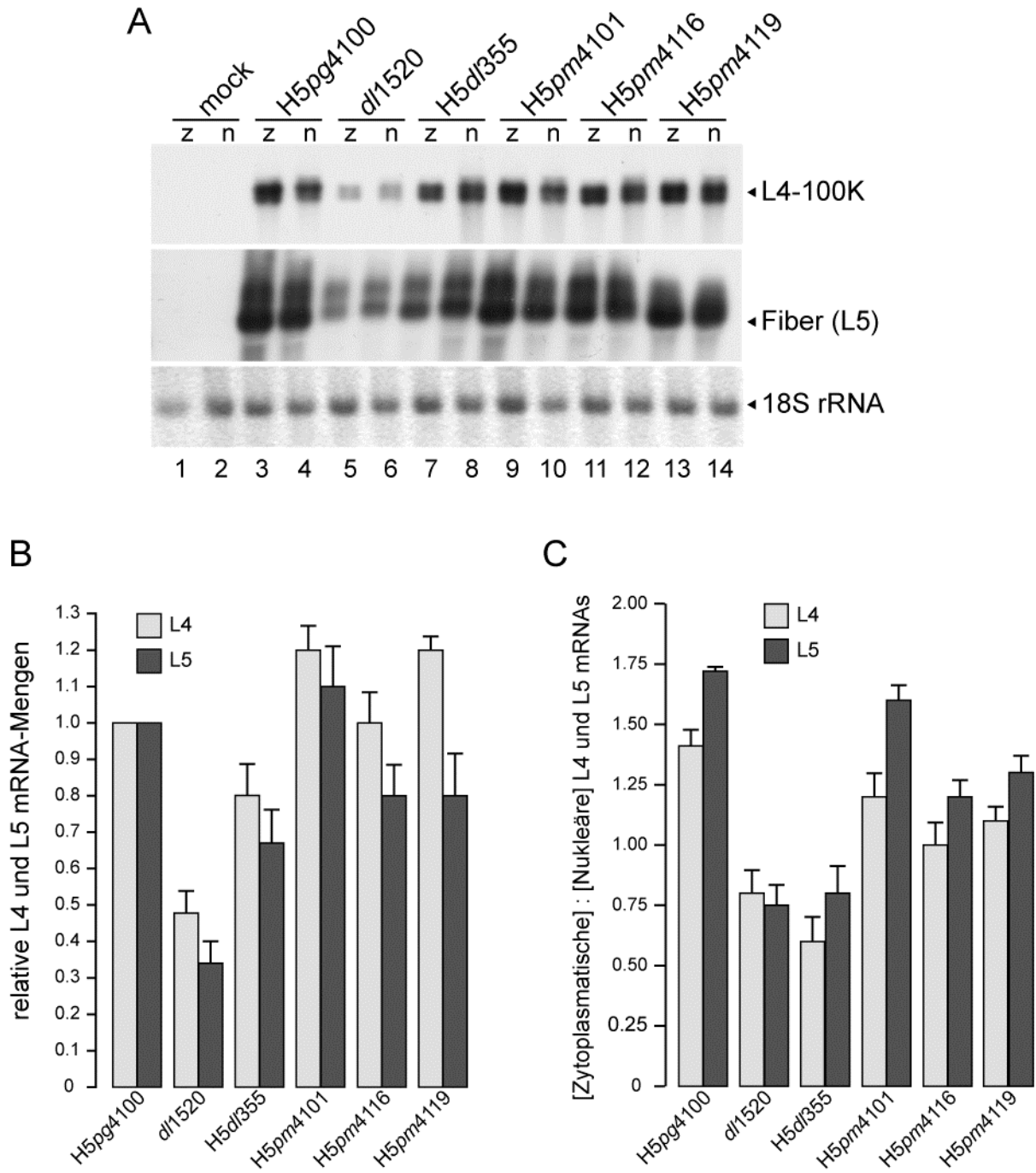
**Abb. 21 Produktion von Nachkommenviren**

Um die Ausbeute an Nachkommenviren zu bestimmen wurden HeLa- bzw. A549-Zellen mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 10) und 72 h p.i. geerntet. Aus den infizierten Zellen wurden die Nachkommenviren isoliert und anschließend auf 911-Zellen austitriert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

Die E4orf6-Deletionsmutante H5dl355 produzierte wie erwartet mehr Nachkommenviren als die Virusmutante dl1520, jedoch ca. 3-mal weniger als das Wildtypvirus bzw. die Virusmutante H5pm4101. Konsistent zur verzögerten Produktion der späten Proteine konnten Zellen, die mit den Virusmutanten H5pm4116 und H5pm4119 infiziert wurden, nur ca. 70 - 80 % der Nachkommenviren im Vergleich zum Wildtypvirus herstellen. Dieser Defekt könnte jedoch wieder in Zusammenhang mit den verringerten Gleichgewichtsmengen der E4orf6-NES-Proteine (Abb. 17 B) stehen.

### **5.3.6 Mutationen im NES von E4orf6 führen zu einer leicht verminderten Exporteffizienz später viraler mRNAs**

Um zu überprüfen, ob der Defekt bei der Produktion später viraler Proteine und Nachkommenviren in den Virusmutanten H5pm4116 und H5pm4119 auf einen verminderten Export viraler mRNAs aus dem Kern ins Zytoplasma zurückzuführen ist, sollten im nächsten Schritt dieser Arbeit *Northern Blot*-Analysen in infizierten Zellen durchgeführt werden. Dazu wurden A549-Zellen infiziert (4.3.4), nach 48 h geerntet und die RNA aus dem Zytoplasma und dem Kern isoliert (4.5.2). Die Methylenblau angefärbte zelluläre 18S rRNA diene als interne Ladekontrolle (Abb. 22 A). Anschließend wurde die RNA mit Digoxigenin-markierten cRNA-Sonden gegen Fiber und L4-100K hybridisiert (Abb. 22 A). Die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen wurden mit Hilfe der ImageJ-Software (Abramoff *et al.*, 2004) quantifiziert und sind in Abb. 22 B dargestellt.



**Abb. 22 Northern Blot-Analyse**

(A) A549-Zellen wurden mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 10) und 48 h p.i. geerntet. Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht infiziert (mock). Es wurden je 1 µg zytoplasmatische (z) und nukleäre (n) mRNA über 1 %ige FA-Gele aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Der Nachweis der L4-RNA bzw. der Fiber (L5)-RNA erfolgte mit Digoxigenin-markierten RNA-Sonden. Die 18S rRNA-Bande wurde mit Hilfe von Methylenblaufärbung sichtbar gemacht und diente als interne Ladekontrolle. (B) Die Intensität der erhaltenen Banden der L4- bzw. der L5-RNA 48 h p.i. wurde mit der ImageJ-Software (Abramoff *et al.*, 2004) bestimmt, mit Hilfe der 18S rRNA Werte korrigiert und graphisch dargestellt, wobei der mRNA-Level des Wildtypvirus als Referenzwert auf 1 normiert wurde. (C) Das Verhältnis der Gleichgewichtsmengen zytoplasmatischer zu nukleärer mRNA diente als Maß für die Exporteffizienz der einzelnen Virusmutanten.

Wie bereits beschrieben (Abb. 14 A) war die Gesamtmenge an L4- und L5-mRNA in der Virusmutante *dl1520* (L4 ca. 50% und L5 ca. 35% vom wt) 48 h p.i. stark verringert (Abb. 22 A, Spuren 5 und 6; Abb. 22 B). Auch in der Mutante *H5dl355* war eine leichte Reduktion der mRNA-Level detektierbar (L4 ca. 80 % und L5 ca. 70 % vom wt; Abb. 22 A, Spuren 7 und 8; Abb. 22 B). Im Gegensatz dazu war die Menge an L4-RNA in den Virusmutanten *H5pm4101* (Abb. 22 A, Spuren 9 und 10; Abb. 22 B), *H5pm4116* (Abb. 22 A, Spuren 11 und 12; Abb. 22 B) und *H5pm4119* (Abb. 22 A, Spuren 10 und 11; Abb. 22 B) etwa vergleichbar zu der des Wildtypvirus. Auch die L5-RNA-Mengen zwischen E1B-NES und wt waren ähnlich, wohingegen in den Virusmutanten *H5pm4116* und *H5pm4119* nur ca. 80 % der L5-RNA im Vergleich zum Wildtypvirus detektiert werden konnte. In Abb. 22 C ist das Verhältnis der Gleichgewichtsmengen zytoplasmatischer zu nukleärer mRNA dargestellt, das als Maß für die Exporteffizienz der verschiedenen Virusmutanten dient. Wie erwartet waren die Virusmutanten *dl1520* und *H5dl355* stark in der zytoplasmatischen Akkumulation von L4- und L5-Transkripten eingeschränkt. Die E1B-NES-Mutante, zeigte einen leichten Exportdefekt im Vergleich zum Wildtypvirus. Die Exporteffizienz bei Virusmutanten, die Mutationen im NES des E4orf6-Proteins trugen, lag bei ca. 70 % verglichen mit *H5pg4100*. Diese Ergebnisse sind konsistent mit den Resultaten aus der Untersuchung der Produktion später viraler Proteine (Abb. 20) und Nachkommenviren (Abb. 21) und deuten darauf hin, dass die Mutation im NES von E4orf6 zu einem im Vergleich zum Wildtypvirus verringerten Export später viraler Transkripte führt. Dieser verminderten Akkumulation folgt dann eine verzögerte bzw. verringerte Synthese später viraler Proteine und Nachkommenviren. Wie bereits in den vorherigen Kapiteln erwähnt wäre es jedoch auch denkbar, dass dieser Defekt in Zusammenhang mit den geringeren Gleichgewichtsmengen der E4orf6-NES-Proteine (Abb. 17 B) steht.

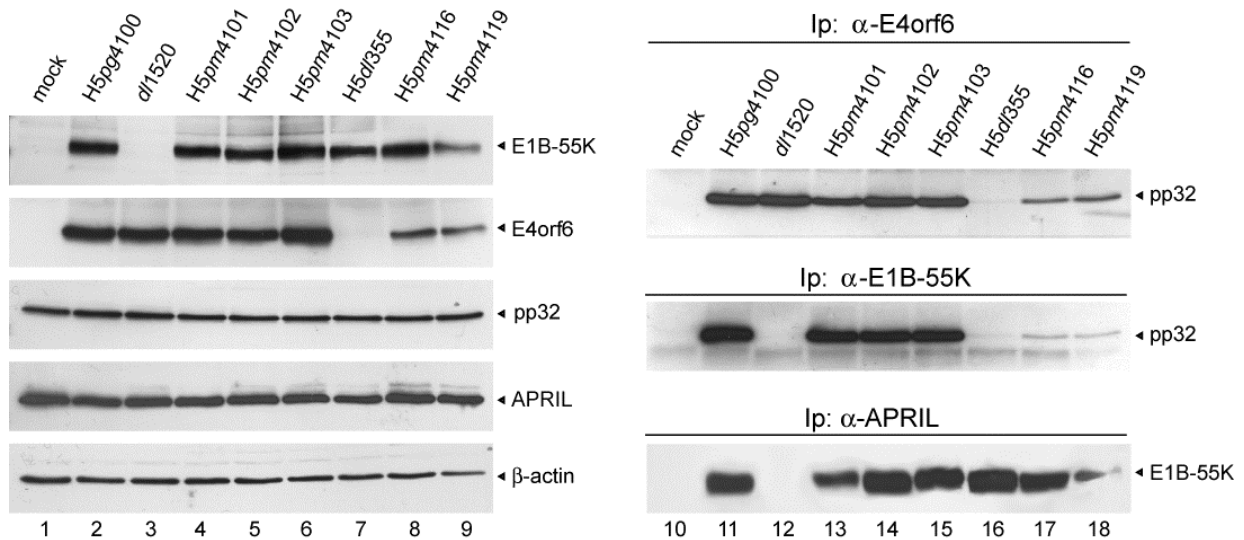
Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass der NES-abhängige Export sehr wahrscheinlich nicht der einzige und relevante Exportweg später viraler mRNAs ist. Dies ist konsistent mit neueren Untersuchungen, die zeigen, dass die Inhibition des CRM1-abhängigen Exports mit Leptomycin B (LMB) in infizierten

Zellen nur einen geringen Einfluss auf die Synthese später viraler Proteine hat (Carter *et al.*, 2003). Auch die Verwendung von Peptid-Inhibitoren gegen den Exportrezeptors CRM1 führt zu keiner Verringerung des nukleären Exports viraler Fiber- und Penton-mRNA in infizierten Zellen (Flint *et al.*, 2005). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde nun die Interaktion von E1B-55K mit verschiedenen Proteinen untersucht, die bei der Prozessierung bzw. dem Export von zellulärer mRNA eine Rolle spielen. Dabei sollten neue Einsichten zum Verständnis des Exports adenoviraler mRNAs gewonnen werden.

### 5.3.7 E1B-55K bindet an APRIL, E4orf6 an pp32

Untersuchungen von Harada und Mitarbeitern zeigten, dass E1B-55K mit einer Vielzahl zellulärer Proteine wechselwirkt, darunter auch pp32 (Harada *et al.*, 2002). pp32 gehört zur Familie von saueren, Leucin-reichen, nukleären Phosphoproteinen (ANP32, *acidic nuclear proteins*), die bei verschiedenen zellulären Prozessen eine Rolle spielen (Malek *et al.*, 1990; Walensky *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1996; Bai *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2001; Matilla und Radrizzani, 2005). pp32 dient außerdem als Ligand für HuR, das zur ELAV (*embryonic lethal abnormal vision*) Familie RNA-bindender Proteine gehört und die Stabilität und den Export von mRNAs, die AU-reiche Elemente (ARE) beinhalten, reguliert (Ma *et al.*, 1996; Brennan und Steitz, 2001). Dabei steigert pp32 die Affinität von HuR an die mRNA und vermittelt dessen Export (Brennan *et al.*, 2000; Brennan und Steitz, 2001; Gallouzi *et al.*, 2001). Zusätzlich zu pp32 bindet auch APRIL (*acidic protein rich in leucine*; Mencinger *et al.*, 1998) als weiterer Ligand an HuR. Sowohl HuR, als auch pp32 und APRIL können zwischen Kern und Zytoplasma pendeln. Dabei spielt bei pp32 und APRIL ihr Leucin-reiches NES eine wichtige Rolle (Brennan *et al.*, 2000). HuR hingegen wird über einen CRM1-unabhängigen Weg exportiert. Mit Hilfe von Deletionsanalysen konnte die *Shuttle*-Domäne HNS (*HuR nucleocytoplasmic shuttling*) in HuR identifiziert werden, die vermutlich über die Bindung an den Transportrezeptor Transportin 2 sowohl für den nukleären Export als auch Import von HuR verantwortlich ist (Fan und Steitz, 1998; Gallouzi und Steitz, 2001). Aufgrund der Beobachtungen, dass CRM1 vermutlich

nicht für den Export adenoviraler mRNA verantwortlich ist, wäre es deshalb denkbar, dass der E1B-55K/E4orf6-Komplex über die Interaktion mit pp32 bzw. APRIL und somit HuR den Export viraler mRNAs ermöglicht. Um dies zu überprüfen, wurden kombinierte Koimmunpräzipitations-/*Western Blot*-Analysen (4.6.5) mit Gesamtzellextrakt aus infizierten A549-Zellen durchgeführt (Abb. 23).



**Abb. 23 Interaktion von E1B-55K bzw. E4orf6 mit pp32 und APRIL**

A549-Zellen wurden mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 20) und 24 h p.i. geerntet. Zur Überprüfung der Expression wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (50 µg für E1B, β-actin, pp32 und APRIL; 100 µg für E4orf6) über 12 %ige SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Antikörpern gegen E1B (2A6), E4orf6 (1807), pp32, APRIL und β-actin (AC-15) als Ladekontrolle inkubiert (Spuren 1 - 9). Zur Koimmunpräzipitation mit pp32 wurde das Zellysate vor dem *Western Blot* mit dem E1B-Antikörper 2A6 bzw. mit dem E4orf6-Antikörper 1807, zur Koimmunpräzipitation mit APRIL mit dem anti-APRIL-Antikörper immunpräzipitiert und dann über 12 %ige SDS-Gele aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mittels *Western Blot* auf Nitrozellulose transferiert und mit Antikörpern gegen pp32 oder E1B (2A6) inkubiert (Spuren 10 - 18).

Die Koimmunpräzipitationsanalysen zeigten, dass die verschiedenen E1B-Proteine an pp32 binden (Abb. 23; Spuren 10, 12, 13 und 14). Diese Bindung ist jedoch abhängig vom E4orf6-Protein, da bei fehlendem E4orf6 (in der Virusmutante H5dl355) keine Wechselwirkung von pp32 mit E1B detektiert werden kann (Abb. 23; Spur 16). Auch in den Virusmutanten H5pm4116 und H5pm4119, die Mutationen im NES von E4orf6 tragen, ist die Bindung von E1B-55K an pp32 aufgrund der reduzierten E4orf6-NES Gleichgewichtsmenge (Abb. 23, Spuren 8 und 9) abgeschwächt (Abb. 23, Spuren 17 und 18). In Übereinstimmung dazu waren alle E4orf6-

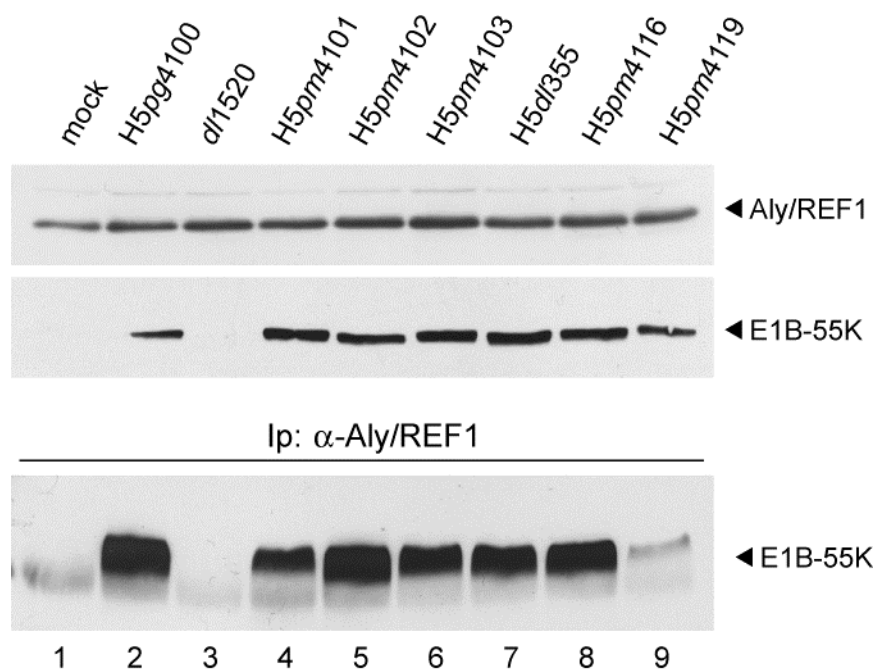
Proteine dazu in der Lage, mit pp32 zu interagieren, wobei wiederum die Bindung an die E4orf6-NES-Proteine aufgrund der reduzierten Gleichgewichtsmenge verringert war. Dies ist konsistent mit Daten von Higashino *et al.*, die ebenfalls die Interaktion von E4orf6 mit pp32 unabhängig von E1B-55K nachweisen konnten (Higashino *et al.*, 2005). Außerdem konnte APRIL als neuer Interaktionspartner von E1B-55K identifiziert werden (Abb. 23, Spuren 10 - 18). Hierbei handelt es sich um eine von E4orf6 unabhängige Wechselwirkung, da auch in der H5dl355-Mutante eine Bindung nachgewiesen werden konnte (Abb. 23, Spur 16). In der Virusmutante H5pm4101 war die Bindung an APRIL leicht (Abb. 23, Spur 13), in H5pm4119 dagegen stark abgeschwächt (Abb. 23, Spur 18). Da die E1B-Proteine beider Mutanten an nukleären Strukturen aggregieren, könnte dies eine mögliche Erklärung für die abgeschwächte Interaktion mit APRIL sein. Zudem war die Menge an E1B, die bei der Mutante H5pm4119 in die Immunpräzipitation eingesetzt wurde geringer (Abb. 23, Spur 9) als bei den übrigen Mutanten, was ebenfalls zur verringerten Bindung beitragen könnte.

### 5.3.8 E1B-55K bindet an Aly/REF

Neueste Analysen zeigen, dass das Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV1) Protein ICP27 virale mRNA mit Hilfe des Exportfaktors TAP/NXF1 (*nuclear export factor 1*) vom Kern ins Zytoplasma transportiert. Dabei bindet ICP27 sowohl an TAP/NXF1 als auch an Aly/REF1 (*RNA and export factor binding protein 1*; Koffa *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005). TAP/NXF1 ist einer der wichtigsten Transportfaktoren beim Export zellulärer mRNAs (Erkman und Kutay, 2004). Aly/REF1 gehört zur Familie der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine (hnRNP) und ist Bestandteil des Exon-Junction-Komplex (EJC; Le Hir *et al.*, 2000). Da es sowohl an RNA als auch an TAP/NXF1 bindet und zwischen Zellkern und Zytoplasma pendelt, könnte es am Export von mRNA beteiligt sein (Zhou *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2001; Gatfield und Izaurralde, 2002). Aufgrund dieser Beobachtungen wäre es denkbar, dass E1B-55K, vergleichbar zu ICP27 den Exportrezeptor TAP/NXF1 über die Bindung mit Aly/REF1 an die virale mRNA rekrutiert. Zur Überprüfung dieser Hypothese



wurden zunächst Koimmunpräzitationsanalysen (4.6.5) mit Gesamtzellextrakt aus infizierten A549-Zellen durchgeführt (Abb. 24).



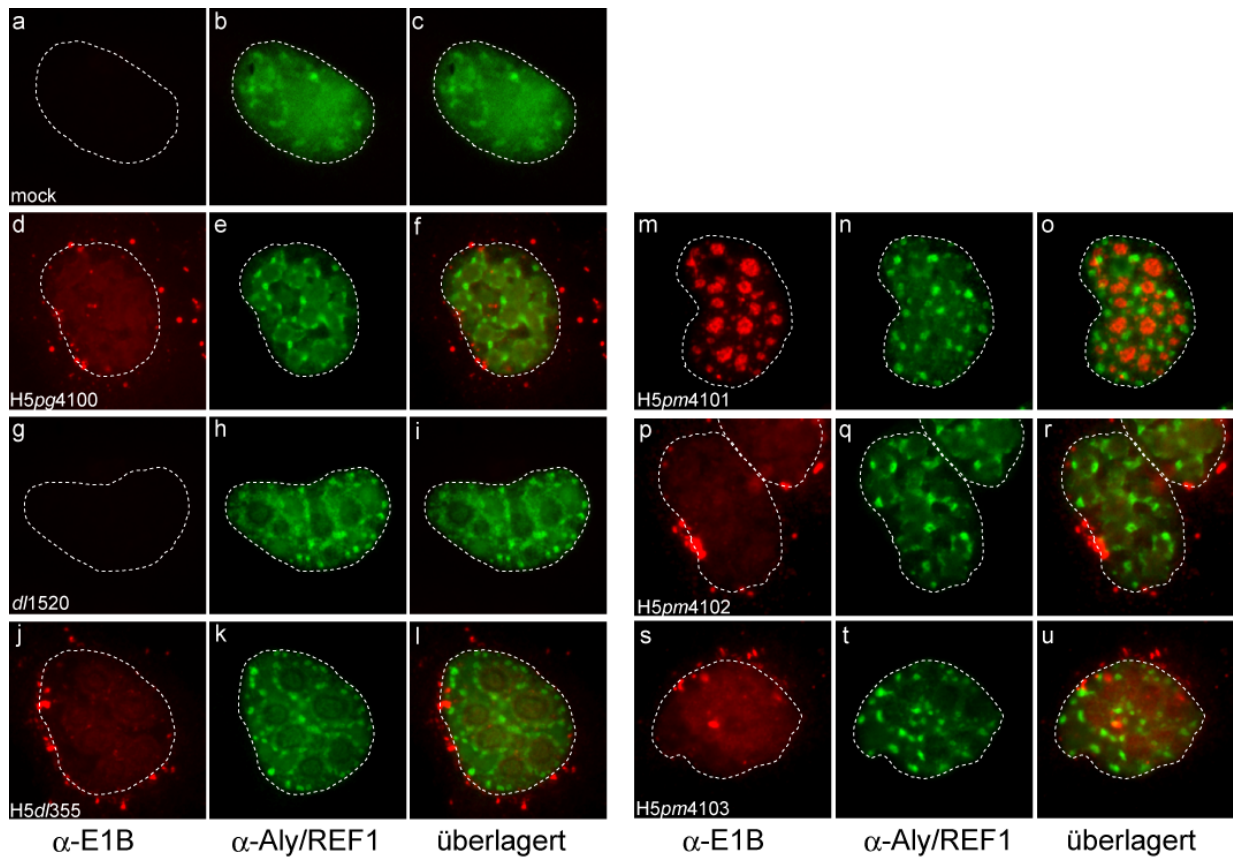
**Abb. 24 Interaktion von E1B-55K mit Aly/REF1**

A549-Zellen wurden mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 20) und 24 h p.i. geerntet. Zur Überprüfung der Expression wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (50 µg für E1B; 25 µg für Aly/REF1) über 12 %ige SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Antikörpern gegen E1B (2A6) und Aly/REF1 inkubiert. Zur Koimmunpräzitation wurde das Zelllysate vor dem *Western Blot* mit dem anti-Aly/REF1-Antikörper immunpräzipitiert und dann über 12 %ige SDS-Gele aufgetrennt. Anschließend mittels *Western Blot* auf Nitrozellulose transferiert und mit dem Antikörper E1B (2A6) inkubiert.

Interessanterweise konnte zum ersten Mal eine Bindung von E1B-55K an Aly/REF1 nachgewiesen werden (Abb. 24). Dabei war die Wechselwirkung an Aly/REF1 durch die Mutation im NES von E1B-55K leicht abgeschwächt (Abb. 24, Spur 4). Die Mutation der NESs von E1B und E4orf6 führte zu einer stark verringerten Bindung an Aly/REF1 (Abb. 24, Spur 9). Da auch in der Virusmutante H5dl355 eine Interaktion nachgewiesen werden konnte (Abb. 24, Spur 7), ist die Bindung unabhängig von E4orf6. Die Bindung an Aly/REF1 und somit indirekt an den Exportfaktor TAP/NXF1 deutet erstmals auf eine Beteiligung von TAP/NXF1 am Export adenoviraler mRNA hin. Dies ist konsistent mit Untersuchungen, die zeigten, dass CRM1 vermutlich nicht der Haupt-Exportfaktor adenoviraler mRNA ist (Carter *et al.*,

2003; Flint *et al.*, 2005). Da für E1B-55K bisher nur sehr unspezifische und schwache RNA-Bindeigenschaften nachgewiesen werden konnten (Horridge und Leppard, 1998), könnte die Bindung an Aly/REF1 die Wechselwirkung zwischen E1B und viraler mRNA darstellen.

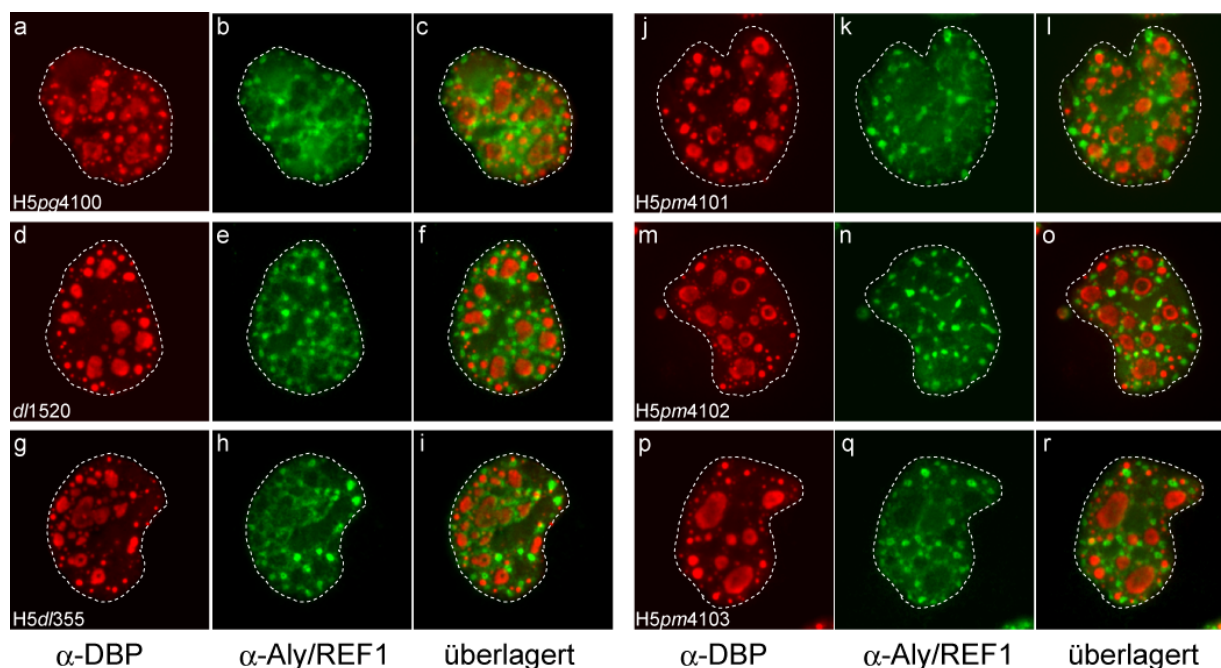
Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde im nächsten Schritt die subzelluläre Verteilung von E1B-55K und Aly/REF1 in infizierten A549-Zellen untersucht (Abb. 25). Unter anderem sollte dadurch die Frage geklärt werden, ob sich die Interaktion der beiden Proteine auch in einer gemeinsamen Lokalisation widerspiegelt.



**Abb. 25 Immunfluoreszenzanalysen zur Kolokalisation von E1B-55K und Aly/REF1**

A549-Zellen wurden auf Objektträger ausgesät und bei einer Konfluenz von 60 % mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 20) und 20 h p.i. mit PFA fixiert. (A) Die Zellen wurden *in situ* mit dem anti-E1B-Antikörper 2A6 aus Maus und dem anti-Aly/REF1-Antikörper aus Kaninchen doppelmarkiert. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte mit einem *Texas Red*-gekoppelten anti-Maus-Antikörper und einem FITC-gekoppelten anti-Kaninchen-Antikörper. Überlagerungen der Lokalisationen von E1B-55K (rot; a, d, g, j, m, p, s) und Aly/REF1 (grün; b, e, h, k, n, q, t) sind in c, f, i, l, o, r und u dargestellt. Die gestrichelten Linien in den Bildern geben jeweils die Lage und Größe des Zellkerns an.

Die Lokalisation von Aly/REF1 gleicht den bereits beschriebenen Verteilungsmustern von Spleißfaktoren in Adenovirus-infizierten Zellen (Bridge *et al.*, 1993a; Bridge *et al.*, 1995; Bridge *et al.*, 1996; Aspegren *et al.*, 1998; Aspegren und Bridge, 2002; Gama-Carvalho *et al.*, 2003). In nicht-infizierten Zellen ist Aly/REF1 im Zellkern lokalisiert, wo es neben einer diffusen Verteilung auch in stärker angefärbten Strukturen vorkommt (Abb. 25 b). Nach Infektion kann man zwei Verteilungsmuster unterscheiden, die sich vermutlich auf den zeitlichen Verlauf der Virusinfektion beziehen. Zunächst ist Aly/REF1 diffus verteilt, wobei ringförmige Bereiche eine schwächere Färbung aufweisen und nur wenige stärker angefärbte Strukturen sind detektierbar sind (Abb. 25 h und k). Im weiteren Verlauf der Infektion wird Aly/REF1 in mehreren nukleären Strukturen konzentriert (Abb. 25 e, n, q und t), die vermutlich mit den Interchromatinkörperchen (IG, *interchromatin granules*), die spät im viralen Replikationszyklus auftreten (Puvion-Dutilleul *et al.*, 1994), identisch sind. Die einzige Kolokalisation, die zwischen E1B-55K und Aly/REF1 detektierbar ist, ist die diffuse Färbung im Nukleus in den Virusmutanten H5dl355, H5pm4102 und H5pm4103. Durch die Mutation des E1B-NES aggregiert das E1B-Protein fast ausschließlich in definierten nukleären Strukturen, an deren Peripherie die Aly/REF1-positiven IGs lokalisieren. Da sich die Lokalisationen fast ausschließen, könnte dies eine mögliche Erklärung für die abgeschwächte Bindung von E1B-NES an Aly/REF1 sein. Bei den E1B-positiven nukleären Strukturen handelt es sich, wie in Abb. 9 A, j – l und Abb. 9 B, a – c gezeigt, um die viralen Replikations- und Transkriptionszentren. Bekanntermaßen werden in Adenovirus-infizierten Zellen viele Spleißfaktoren zu Orten der viralen Transkription relokalisiert. Deshalb wurde auch die Kolokalisation von Aly/REF1 mit dem adenoviralen DNA-bindenden Protein (DBP), untersucht (Abb. 26).



**Abb. 26 Immunfluoreszenzanalysen zur Lokalisation von DBP und Aly/REF1**

A549-Zellen wurden auf Objektträger ausgesät und bei einer Konfluenz von 60 % mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert und 20 h p.i. mit PFA fixiert. (A) Die Zellen wurden *in situ* mit dem anti-DBP-Antikörper B6-8 aus Maus und dem anti-Aly/REF1-Antikörper aus Kaninchen doppelmarkiert. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte mit einem *Texas Red*-gekoppelten anti-Maus-Antikörper und einem FITC-gekoppelten anti-Kaninchen-Antikörper. Überlagerungen der Lokalisationen von DBP (rot; a, d, g, j, m, p) und Aly/REF1 (grün; b, e, h, k, n, q) sind in c, f, i, l, o und r dargestellt. Die gestrichelten Linien in den Bildern geben jeweils die Lage und Größe des Zellkerns an.

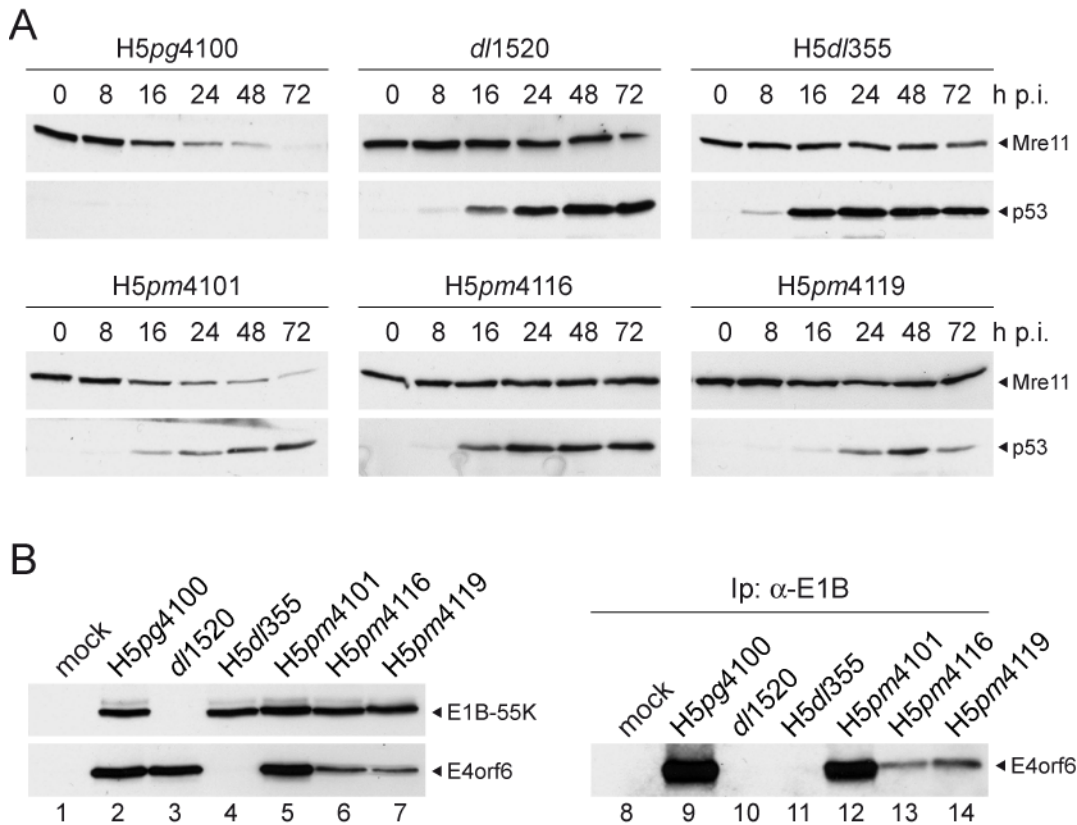
Die Immunfluoreszenzanalysen zeigen, dass die schwächer angefärbten ringförmigen Bereiche, die bei der Aly/REF1-Färbung in Abb. 25 h und k detektiert wurden zum Teil mit den adenoviralen Replikationszentren übereinstimmen. Das bedeutet, dass Aly/REF1, v. a. um die Replikationszentren herum konzentriert ist. Ein vergleichbares Lokalisationsmuster konnte bei verschiedenen Spleißfaktoren festgestellt werden (Bridge *et al.*, 1993a; Bridge *et al.*, 1995; Bridge *et al.*, 1996; Aspegren *et al.*, 1998; Aspegren und Bridge, 2002; Gama-Carvalho *et al.*, 2003). Dies ist konsistent mit Beobachtungen, dass die virale Transkription hauptsächlich an der Peripherie der DBP-positiven Strukturen, die die Orte der viralen Replikation darstellen, stattfindet (Puvion-Dutilleul und Puvion, 1991; Bridge *et al.*, 1993a; Pombo *et al.*, 1994). Auch die stark angefärbten IGs befinden sich in der Nähe der Replikationszentren. Die Bedeutung dieser Subdomänen liegt vermutlich in der Prozessierung und dem Export von viraler mRNA. Da auch Aly/REF1 dort lokalisiert,

unterstützt dies die Theorie, dass es an der Prozessierung und am Export viraler RNA beteiligt sein könnte.

### **5.3.9 Mutationen im NES von E4orf6 vermindern den proteasomalen Abbau von p53 und Mre11 in infizierten Zellen**

Neben der Funktion des E1B-55K/E4orf6-Komplexes beim Export viraler mRNA aus dem Kern, spielt der virale Proteinkomplex eine wichtige Rolle bei der proteasomalen Degradation bestimmter Proteine. Dabei bildet ein Komplex aus E1B-55K zusammen mit E4orf6 und weiteren zellulären Proteinen eine E3-Ubiquitin-Ligase deren Funktion die Ubiquitinylierung und somit Destabilisierung von Proteinen ist (Querido *et al.*, 2001a; Harada *et al.*, 2002; Blanchette *et al.*, 2004). Bisher identifizierte Zielproteine sind p53 und Mre11.

Um zu testen, ob der CRM1-vermittelte Export von E1B-55K bzw. E4orf6 einen Einfluss auf den Abbau von p53 und Mre11 hat, wurden A549-Zellen infiziert (4.3.4), nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und aufgeschlossen (4.2.5 und 4.6.1.1). Zum Nachweis des Abbaus von p53 und Mre11 wurden *Western Blot*-Analysen durchgeführt (4.6.3; Abb. 27).



**Abb. 27 Abbau von p53 und Mre11 und Interaktion von E1B mit E4orf6 in Ad-infizierten Zellen**

(A) Subkonfluente A549-Zellen wurden mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 20) und zu den angegebenen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet. Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht infiziert (mock). Es wurden jeweils 100 µg Gesamtzellextrakt über 12 %ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt, auf Nitrozellulose mittels *Western Blot* transferiert und mit den Antikörpern gegen Mre11 und p53 (DO-1) inkubiert. (B) A549-Zellen wurden mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 20) und 24 h p.i. geerntet. Zur Überprüfung der Expression wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (50 µg für E1B, 100 µg für E4orf6) über 12 %ige SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit dem E1B-Antikörper 2A6 bzw. mit dem E4orf6-Antikörper 1807 inkubiert (Spuren 1 – 7). Zur Koimmunpräzipitation wurde das Zelllysate vor dem *Western Blot* mit dem E1B-Antikörper 2A6 immunpräzipitiert und dann über ein 12 %iges SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mittels *Western Blot* auf Nitrozellulose transferiert und mit dem Antikörper gegen E4orf6 (1807) inkubiert (Spuren 8 – 14).

In *dl1520*- bzw. *H5dl355*-infizierten Zellen wurde wie erwartet weder das Tumorsuppressorprotein p53 noch Mre11 proteolytisch abgebaut. Interessanterweise kann in Zellen, die mit der Virusmutante E4orf6-NES (*H5pm4116*)- bzw. Doppel-NES (*H5pm4119*)-infiziert wurden, sowohl p53 als auch Mre11 noch deutlich detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass für die effiziente Degradation ein funktionelles NES im E4orf6-Protein benötigt wird. Dieser verminderte Abbau könnte allerdings auch auf die verringerte E4orf6-Menge zurückgeführt werden (Abb. 17 B; 27 B,

Spuren 6 und 7). Zudem beeinflusst die Mutation im NES des E4orf6-Proteins die Interaktion zwischen E1B-55K und E4orf6 (Abb. 27 B, Spuren 13 und 14). Diese verringerte Bindung kann nicht allein durch die geringeren E4orf6-Gleichgewichtsmengen (Abb. 27 B, Spuren 6 und 7) erklärt werden.

Die bisher gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass eine Mutation des NES von E4orf6 zu einer leicht verminderten Menge an L5-mRNA (Abb. 22 B), einer verzögerten Synthese später viraler Proteine (Abb. 20 A) und einer reduzierten Produktion von Nachkommenviren (Abb. 21) führt. Dies korreliert jedoch mit einer verringerten Gleichgewichtsmenge an E4orf6 (Abb. 17 B) und einer reduzierten Bindung an E1B-55K (Abb. 27 B). Eine weitere mögliche Erklärung für die Defekte der Virusmutanten H5pm4116 und H5pm4119 könnte allerdings auch das Unvermögen dieser Virusmutanten sein, das Tumorsuppressorprotein p53 bzw. den MRN-Komplex abzubauen (Abb. 27 A). Deshalb sollten im nächsten Schritt dieser Arbeiten zwei Virusmutanten charakterisiert werden, deren E1B-Proteine nicht mehr an Mre11 bzw. an p53 binden und somit vermutlich die zellulären Proteine nicht dem proteasomalen Abbau zuführen können. Dadurch sollte geklärt werden, wie sich die erhöhten Mre11- bzw. p53-Proteinmengen auf die virale Replikation auswirken.

#### **5.4 Charakterisierung der Virusmutanten H5pm4109, H5pm4127 und H5pm4143**

Wie bereits erwähnt, ist ein Komplex aus E1B-55K und E4orf6 wichtig für den proteasomalen Abbau von p53 und Mre11. Shen und Mitarbeiter konnten eine E1B-55K-Virusmutante identifizieren, die nicht mehr in der Lage war, p53 dem proteasomalen Abbau zuzuführen (Shen *et al.*, 2001). Diese Virusmutante trägt den AS-Austausch Histidin zu Alanin an Position 260. Da es sich bei dieser Mutante jedoch um eine Ad2/Ad5-Viruschimäre handelt, wurde die Mutation mit Hilfe des in 5.1 beschriebenen Klonierungsschemas in das H5pg4100-Rückgrat eingeführt. Die so entstandene Ad5 Virusmutante wurde als H5pm4109 bezeichnet. Desweiteren

wurde die Virusmutante H5pm4127 hergestellt, die AS-Austausche an Position 454 und 456 (C454S und C456S) im E1B-Protein trägt. Diese Mutation verhindert die Bindung von E1B-55K an und den Abbau von Mre11 in transienten Transfektions-experimenten (Härtl, 2005). H5pm4143 ist eine Doppelmutante, die sowohl die Austausch an AS-Position 260 (H260A) als auch an AS-Positionen 454 und 456 (C454S und C456S) des 55K-Proteins trägt (Abb. 28).

```

251                270    445                461
|                |    |                |
FLANTNLILHGVSFYGFNNT - DETRTRCRPCECGGKHI H5pg4100
..... - .....S·S..... H5pm4127
.....·A·..... - ..... H5pm4109
.....·A·..... - .....S·S..... H5pm4143
    
```

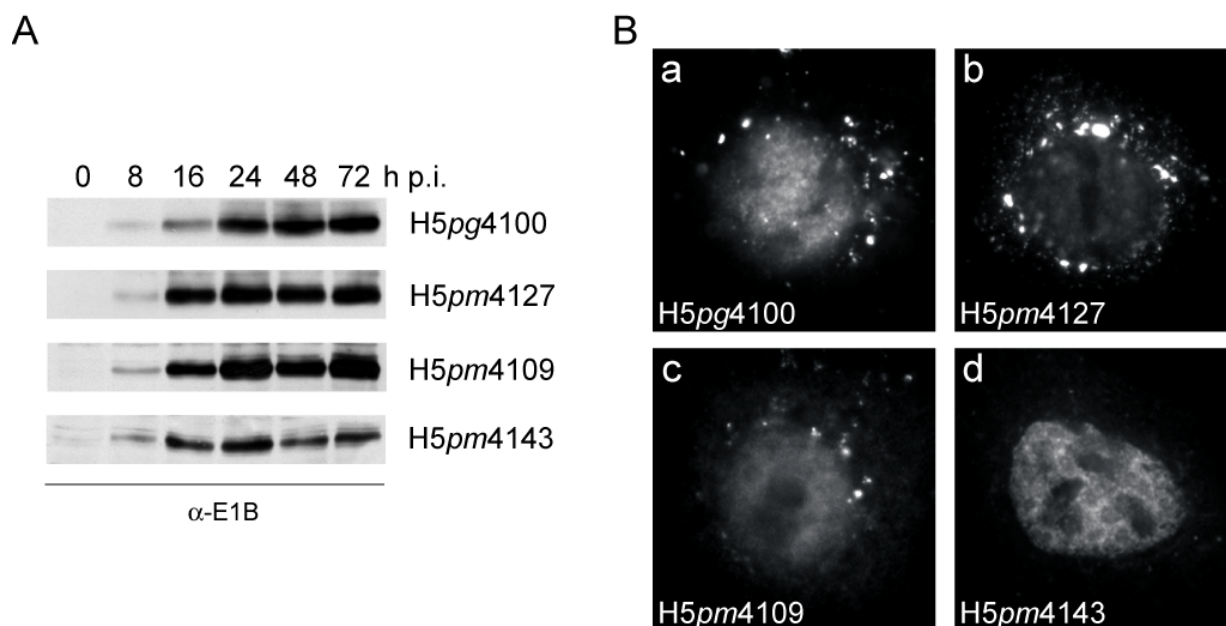
**Abb. 28 H260A- und C454S/C456S-Mutationen im E1B-55K-Protein**

Dargestellt sind zwei Sequenzausschnitte von Ad5 E1B-55K, wobei die Zahlen die AS-Positionen angeben. Markiert sind die AS-Austausche der Virusmutanten H5pm4127 (C454S und C456S), H5pm4109 (H260A) und H5pm4143 (H260A, C454S und C456S) im Vergleich zum Wildtypvirus H5pg4100. Punkte kennzeichnen jeweils gleiche AS.

#### 5.4.1 Mutationen in der Virusmutante H5pm4143 verringern E1B-55K-Gleichgewichtsmengen

Zuerst wurden wiederum die Gleichgewichtsmengen der verschiedenen E1B-55K-Proteine (Abb. 29 A) im Verlauf der Infektion sowie deren subzelluläre Lokalisation (Abb. 29 B) in infizierten A549-Zellen untersucht.





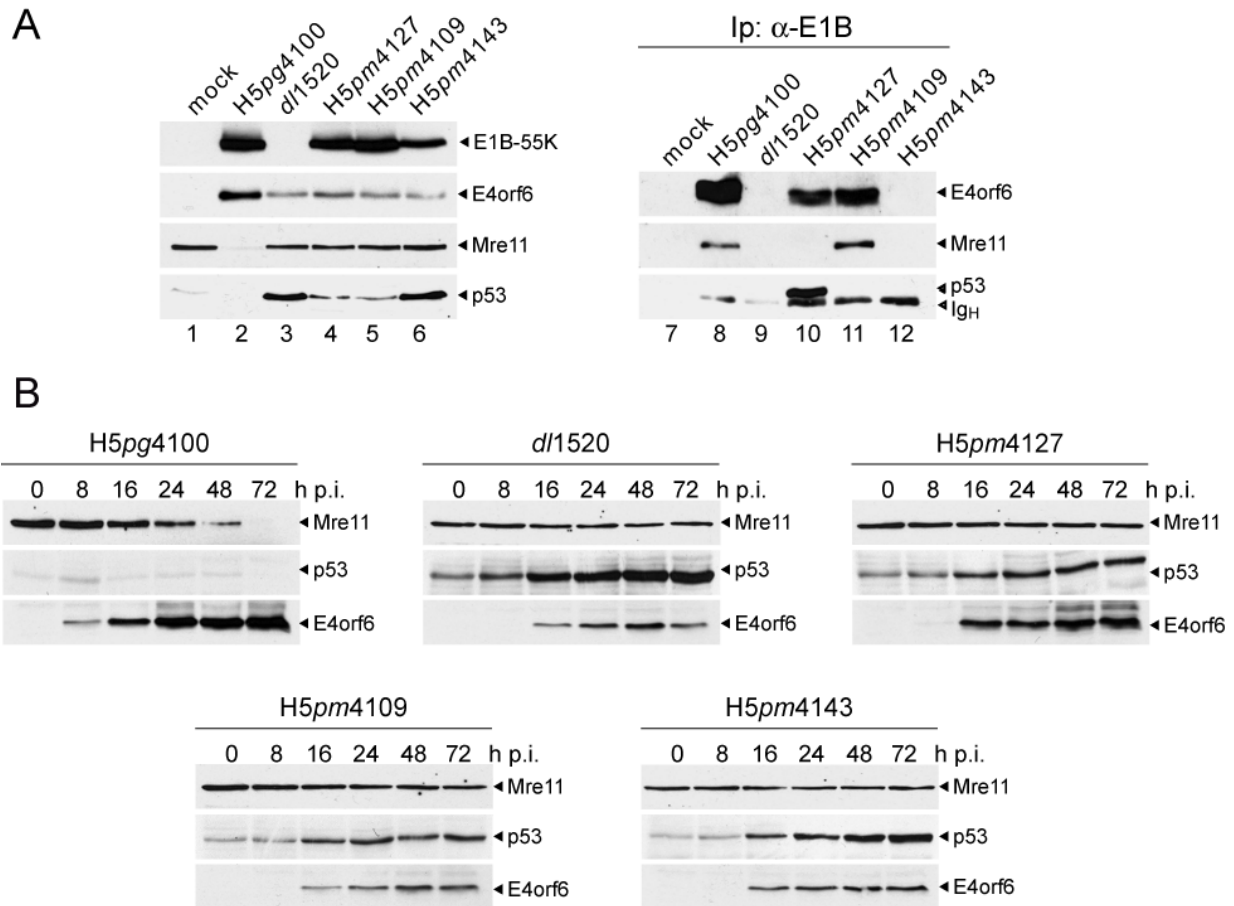
**Abb. 29 Gleichgewichtsmengen und subzelluläre Lokalisation der E1B-H260A- und E1B-C454S/C456S-Mutanten in infizierten Zellen**

(A) A549-Zellen wurde mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 20) und zu den angegebenen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet. Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht infiziert (mock). Es wurden je 20 µg Gesamtzellextrakt über 10 %ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt und mittels *Western Blot* auf Nitrozellulose transferiert. Der Nachweis erfolgte mit dem E1B-55K-spezifischen Maus-Antikörper 2A6. (B) A549-Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät und bei einer Konfluenz von 60 % infiziert. Die Zellen wurden 20 h p.i. mit Methanol fixiert und *in situ* mit dem E1B- spezifischen Antikörper 2A6 inkubiert. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte mit einem FITC-gekoppelten anti-Maus-Antikörper.

Die Virusmutanten H5pm4127 und H5pm4109 zeigen im Vergleich zum Wildtypvirus H5pg4100 keine signifikanten Unterschiede bei der Expression (Abb. 29 A) des E1B-55K-Proteins (Abb. 29 B). E1B-55K ist sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern diffus verteilt. Zudem befindet sich das E1B-55K-Protein in kleinen, meist punktförmigen Strukturen in der Nähe des Zellkerns. Im Vergleich zum Wildtypvirus (Abb. 29 B; a) ist dabei die Zahl dieser zytoplasmatischen Aggregate bei der Virusmutante H5pm4127 etwas erhöht (Abb. 29 B; b), bei der Mutante H5pm4109 stark reduziert (Abb. 29 B; c). Im Gegensatz dazu war die Gleichgewichtsmenge von E1B-55K bei der Doppelmutante H5pm4143 stark vermindert. Dies deutet darauf hin, dass die Kombination der H260A- und der C454S/C456S-Mutationen die Stabilität des viralen Proteins verringern. Zudem zeigte diese Virusmutante keine bzw. nur sehr wenige zytoplasmatische Aggregate und war hauptsächlich diffus im Zellkern verteilt (Abb. 29 B; d).

#### 5.4.2 H260A- und C454S/C456S-Mutationen verhindern den proteasomalen Abbau von Mre11 und p53

Frühere Untersuchungen zeigten, dass der AS-Austausch H260A in der Virusmutante ONYX-053 (Ad2/Ad5-Chimäre) zu einer verminderten Degradation von p53 führt. Zudem wurde gezeigt, dass das mutierte H260A-Protein nicht mehr an in-vitro-translatiertes und <sup>35</sup>S-markiertes p53 binden kann (Shen *et al.*, 2001). Um zu überprüfen, ob auch das E1B-Protein der hier verwendeten Ad5 Mutante H5pm4109 nicht mehr an p53 binden und dieses dem proteasomalen Abbau zuführen kann, wurden Koimmunpräzitationsanalysen aus dem Gesamtzellextrakt infizierter Zellen durchgeführt (Abb. 30 A). Außerdem wurden die Gleichgewichtsmengen von p53 und Mre11 im Verlauf der Virusinfektion untersucht (Abb. 30 B). Aufgrund früherer Beobachtungen in unserer Arbeitsgruppe, dass die Punktmutationen C454S und C456S im E1B-Protein die Bindung an und den Abbau von Mre11 in transienten Transfektionsexperimenten verhindern (Härtl, 2005), sollte nun überprüft werden, ob dies auch im viralen Kontext zutrifft (Abb. 30 A, B). Zusätzlich wurde die Doppelmutante (H5pm4143) untersucht, die weder Mre11 noch p53 abbauen sollte (Abb. 30 A, B).



**Abb. 30 Abbau von p53 und Mre11 und Interaktion von E1B mit Mre11, p53 und E4orf6 in Ad-infizierten Zellen**

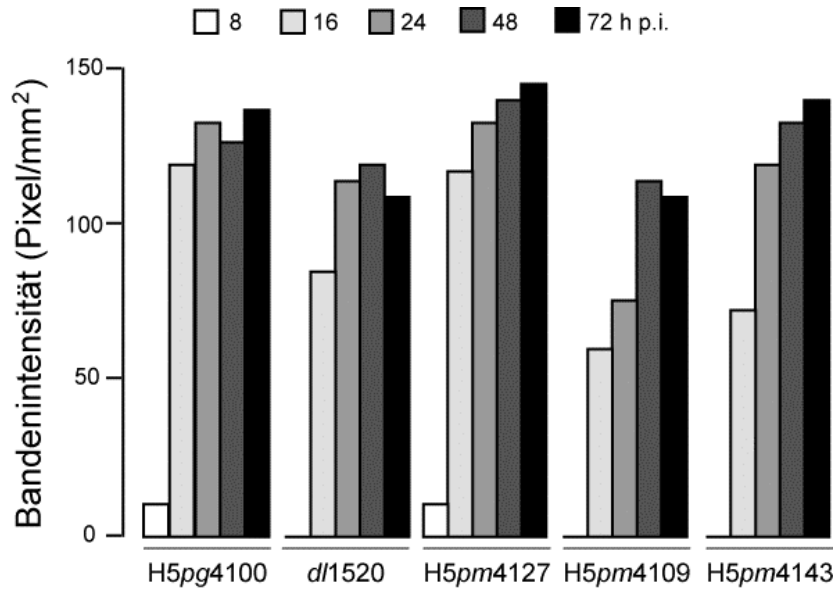
(A) A549-Zellen wurden mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 25) und 18 h p.i. geerntet. Zur Überprüfung der Expression wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (50 µg für E1B, 100 µg für E4orf6, Mre11 und p53) über 12 %ige SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Antikörpern gegen E1B-55K (2A6), E4orf6 (1807), Mre11 und p53 (DO-1) inkubiert (Spuren 1 – 6). Zur Koimmunpräzipitation wurde das Zellysate vor dem *Western Blot* mit dem E1B-Antikörper 2A6 immunpräzipitiert und dann über 12 %ige SDS-Gele aufgetrennt. Anschließend mittels *Western Blot* auf Nitrozellulose transferiert und mit den Antikörpern gegen E4orf6 (1807), Mre11 und p53 (Do-1) inkubiert (Spuren 7 – 12). (B) A549-Zellen wurden mit den Virusmutanten infiziert (moi 20) und zu den angegebenen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet. Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht infiziert (mock). Es wurden jeweils 100 µg Gesamtzellextrakt über 12 %ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt, auf Nitrozellulose mittels *Western Blot* transferiert und mit den Antikörpern gegen Mre11, p53 (DO-1) und E4orf6 (RSA3) inkubiert.

Wie erwartet verhindert die C454S/C456S-Mutation im E1B-Protein (H5pm4127) die Interaktion mit Mre11 (Abb. 30 A, Spur 10). Dies korreliert mit einem reduzierten Abbau von Mre11 während der Virusinfektion (Abb. 30 B). Die *Western Blot*-Analysen zeigen jedoch, dass, trotz der Bindung an p53, auch das Tumorsuppressorprotein von dieser Virusmutante nicht destabilisiert werden kann (Abb. 30 B). Ein

vergleichbares Ergebnis lieferten die Untersuchungen mit der Mutante H5pm4109. Die Punktmutation H260A verhindert auch in virusinfizierten Zellen die Bindung an p53, hat aber keinen Einfluß auf die Mre11-Bindung (Abb. 30 A, Spur 11). Dennoch konnte in H5pm4109-infizierten Zellen weder p53 noch Mre11 vollständig abgebaut werden (Abb. 30 B). Das Wildtypprotein interagiert wie erwartet mit Mre11, es konnte jedoch keine Bindung an p53 nachgewiesen werden (Abb. 30 A, Spur 8). Der Grund hierfür ist vermutlich die sehr geringe p53-Gleichgewichtsmenge (Abb. 30 A, Spur 2), die man auch im Verlauf der Virusinfektion beobachten kann (Abb. 30 B), da das Wildtypvirus p53 schon während der frühen Phase der Infektion dem proteasomalen Abbau zuführt. Das E1B-Protein der Doppelmutante H5pm4143 konnte weder mit Mre11 noch p53 wechselwirken, zusätzlich war es jedoch auch nicht mehr in der Lage mit E4orf6 zu interagieren. Dies zusammen mit der reduzierten E1B-55K-Gleichgewichtsmenge deutet darauf hin, dass die eingebrachten Mutationen zu gravierenden Konformationsänderungen führen, die die Stabilität und Funktion des adenoviralen Proteins beeinträchtigen. Überraschenderweise konnte bei allen untersuchten Virusmutanten eine verringerte Gleichgewichtsmenge an E4orf6 beobachtet werden. Dies wäre ein möglicher Grund für den verminderten Abbau von p53 bei der Virusmutante H5pm4127 bzw. von Mre11 bei der Mutante H5pm4109 während der Virusinfektion.

#### **5.4.3 H260A- und C454S/C456S-Mutationen haben keinen Einfluss auf die virale DNA-Synthese**

Der nächste Schritt zur Charakterisierung der Virusmutanten war die Analyse der viralen DNA-Synthese, die durch ein modifiziertes PCR-Verfahren (4.4.5.3) aus virusinfizierten Zellen bestimmt wurde (Abb. 31).



**Abb. 31 Analyse der viralen DNA-Synthese**

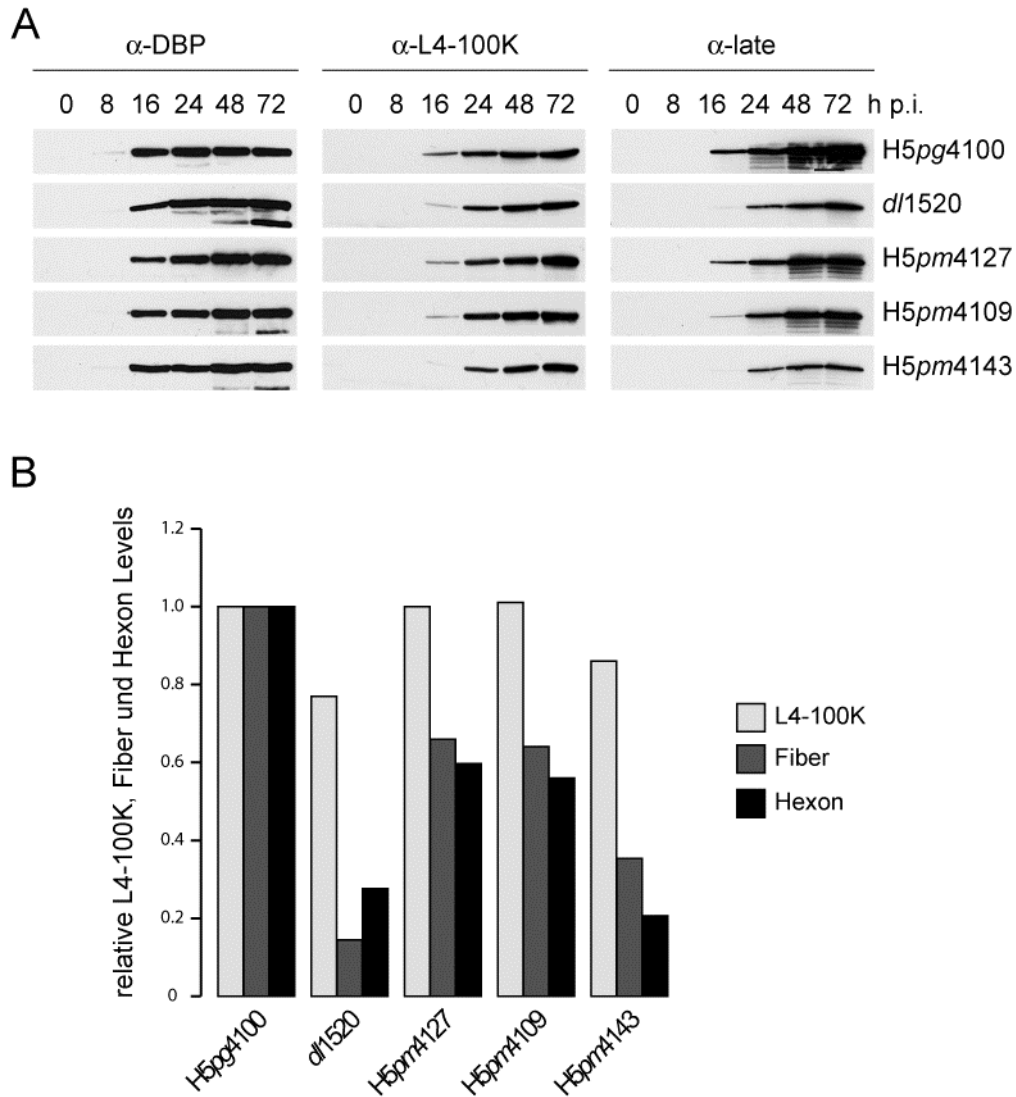
A549-Zellen wurden mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 20) und zu den angegebenen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet. Die virale DNA-Synthese wurde durch PCR wie unter 4.4.5.3 beschrieben bestimmt. Die aus dem Ad5 E1B-Gen amplifizierten PCR-Produkte, wurden auf einem Agarosegel analysiert und die Intensität der Banden in Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen mit dem Computerprogramm *Quantity One* des ChemiDoc (BioRad) bestimmt. Die Auswertung dazu ist graphisch dargestellt.

Die Virusmutante H5pm4127 verhielt sich wie das Wildtypvirus H5pg4100 bei der Akkumulation viraler DNA. dl1520, H5pm4109 und H5pm4143 zeigten im Vergleich zum Wildtyp zwar eine leicht verzögerte Initiation der viralen DNA-Synthese, dies wirkte sich jedoch nicht negativ auf die relative Menge an viraler DNA im späteren Verlauf der Infektion aus. Dies lässt vermuten, dass die erhöhten Proteinnengen von Mre11 und p53 keinen Einfluss auf die virale DNA-Synthese haben.

#### 5.4.4 Erhöhte Mre11- und p53-Mengen korrelieren mit einer reduzierten Produktion später viraler Proteine und Nachkommenviren

Um zu testen, wie sich die erhöhten Mre11- und p53-Gleichgewichtsmengen auf die Synthese später viraler Proteine auswirken, wurden A549-Zellen mit den E1B-Virusmutanten infiziert (4.3.4) und nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet (4.2.5 und 4.6.1.1). Zum Nachweis der späten viralen Proteine wurden *Western Blot*-Analysen durchgeführt (4.6.3). In Abb. 32 sind das frühe DBP und die späten

Proteine L4-100K und Fiber, sowie die Quantifizierung der Bandenstärke des L4-100K-, Fiber- und Hexon-Proteins in infizierten A549-Zellen 48 h p.i. dargestellt.



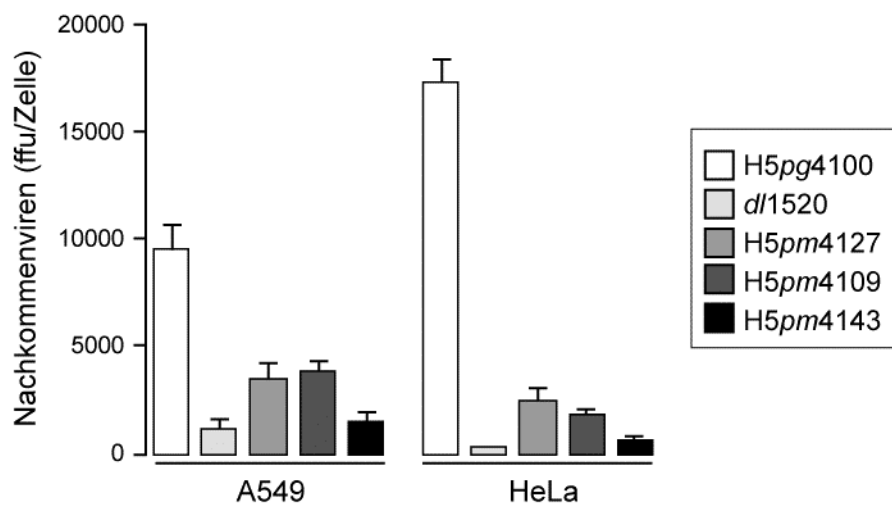
**Abb. 32 Western Blot und Quantifizierung zur Synthese später viraler Proteine**

(A) A549-Zellen wurden mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 20) und zu den angegebenen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet. Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht infiziert (mock). Es wurden je 20  $\mu$ g Gesamtzellextrakt über 10 %ige (für DBP und L4-100K) bzw. 12 %ige (für Kapsidproteine) SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Antikörpern gegen DBP (B6-8), L4-100K (6B10) und gegen die späten Strukturproteine ( $\alpha$ -late) inkubiert. (B) Die Intensität der Banden von L4-100K-, (A), Fiber (A) und Hexon (Western Blot nicht gezeigt) 48 h p.i. wurde mit Hilfe der ImageJ-Software (Abramoff *et al.*, 2004) quantifiziert und graphisch dargestellt. Die Werte von H5pg4100 dienen als Referenzwert und wurden auf 100 % normiert.

Die Western Blot-Analysen zeigten, dass die Synthese des L4-100K-Proteins (Abb. 32

A) in den Virusmutanten *dl1520*, *H5pm4127*, *H5pm4109* und *H5pm4143* im Vergleich zum Wildtyp zwar leicht verzögert beginnt, dies jedoch keinen Einfluss auf die relativen L4-100K-Proteinlevel 48 h p.i. hat (Abb. 32 B). Im Gegensatz dazu ist die Expression später Strukturproteine (Fiber und Hexon) bei diesen Virusmutanten nicht nur verzögert, sondern die Proteinmengen sind im Vergleich zum wt auch stark reduziert. Dabei zeigt die Doppelmutante *H5pm4143* den größten Defekt, der vergleichbar zur E1B-Deletionsmutante *dl1520* ist. Die Analyse von DBP zeigt, dass die Expression früher Proteine nicht von den erhöhten Mre11- und p53-Mengen beeinflusst wird, da die Expression in allen untersuchten Virusmutanten gleich ist.

Um zu testen wie sich die verminderte Gleichgewichtsmenge später Strukturproteine auf die Produktion von Nachkommenviren auswirkt, wurde die Ausbeute an Nachkommenviren in HeLa- und A549-Zellen untersucht (Abb. 33).



**Abb. 33 Produktion von Nachkommenviren**

Um die Ausbeute an Nachkommenviren zu bestimmen wurden HeLa- bzw. A549-Zellen mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 10) und 72 h p.i. geerntet. Aus den infizierten Zellen wurden die Nachkommenviren isoliert und anschließend auf 911-Zellen austitriert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

Konsistent mit der Synthese später Strukturproteine zeigten die untersuchten Virusmutanten starke Defekte bei der Produktion von Nachkommenviren sowohl in A549-Zellen als auch in HeLa-Zellen. Dabei war die Doppelmutante wiederum ähnlich defekt wie die E1B-Deletionsmutante, was auf einen gravierenden Funktionsverlust

des E1B-55K-Proteins dieser Virusmutante hindeutet.

Somit zeigen die bisher durchgeführten Analysen, dass die erhöhten Gleichgewichtsmengen von Mre11 und p53 mit einer stark verringerten Produktion später viraler Strukturproteine (Abb. 33) und Nachkommenviren korrelieren (Abb. 33). Der Defekt dieser Virusmutanten könnte jedoch zum Teil auch mit der verringerten Proteinstabilität der E4orf6-Proteine (Abb. 30 B) in Zusammenhang stehen.

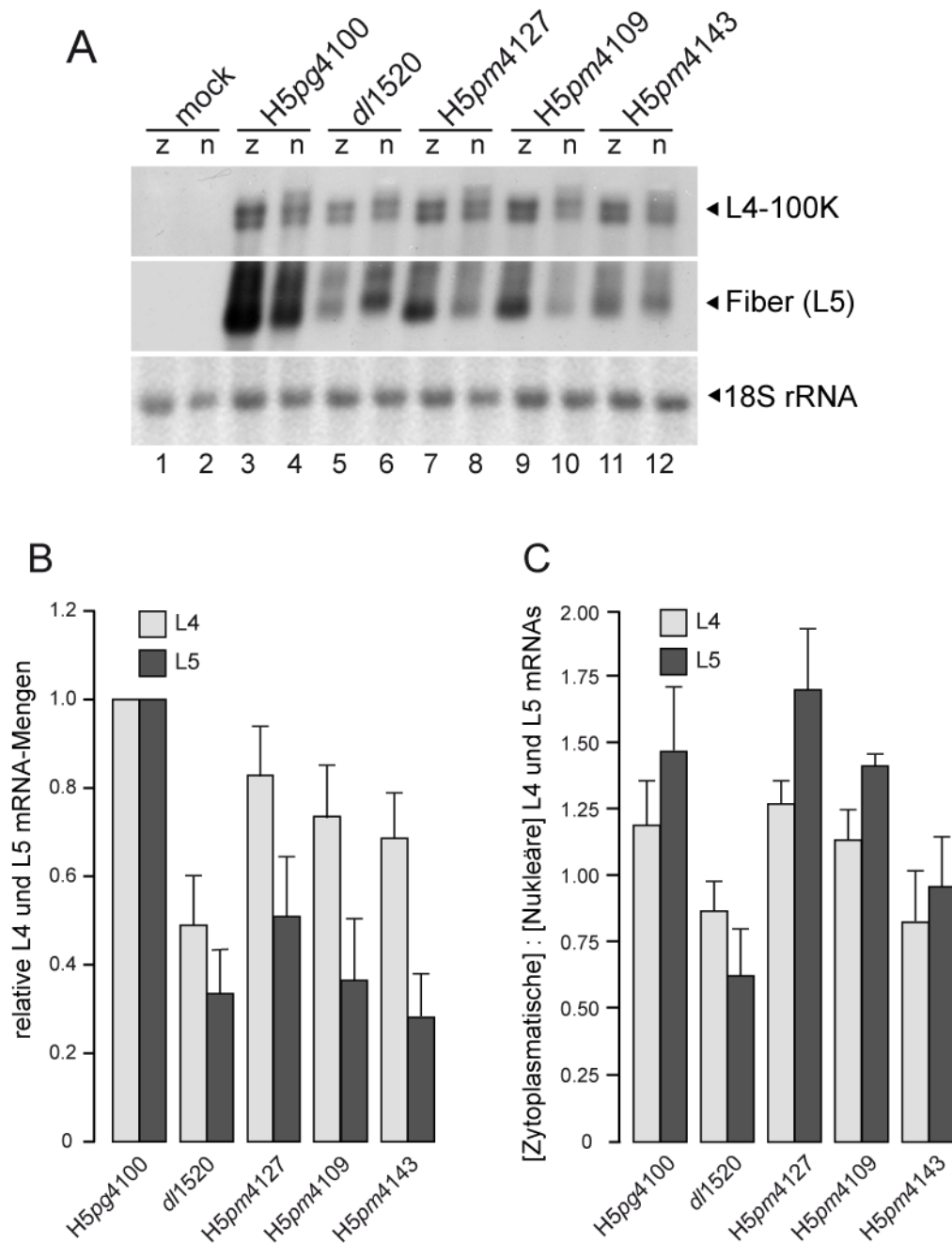
#### **5.4.5 H260A- und C454S/C456S-Mutationen führen zu einer reduzierten Mengen an später L5-mRNA, haben aber keinen Einfluss auf deren Export**

Ein Grund für die verminderte Anzahl später Strukturproteinen und Nachkommenviren könnte ein Defekt während des Kernexports später viraler mRNA sein. Um dies zu überprüfen, wurden *Northern Blot*-Analysen in infizierten Zellen 48 h p.i. durchgeführt (4.5.2, 4.5.5 und 4.5.6; Abb. 34).

Die *Northern Blot*-Analysen zeigen jedoch, dass die Virusmutanten H5pm4109 und H5pm4127 späte virale L4- und L5-mRNA genauso effizient wie das Wildtypvirus aus dem Zellkern transportierten (Abb. 34 C). Die Mutante H5pm4143 verhielt sich wie schon in den vorherigen Experimenten wie die E1B-Deletionsmutante. Interessanterweise führten die H260A- und die C454S/C456S-Mutationen zu einer stark verringerten Gleichgewichtsmenge von L5-Transkripten (Abb. 34 A und B). Die L4-mRNA war davon nur leicht betroffen (Abb. 34 A und B). Daraus kann man schließen, dass die Abnahme der späten Strukturproteine (Abb. 32) und der Nachkommenviren (Abb. 33) vermutlich auf die verringerten L5-mRNA-Mengen zurückgeführt werden können.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die erhöhten Mre11- und p53-Mengen zwar keinen Einfluss auf den Export, jedoch auf die Stabilität und/oder die Transkriptionsrate von mRNAs der MLTU haben.



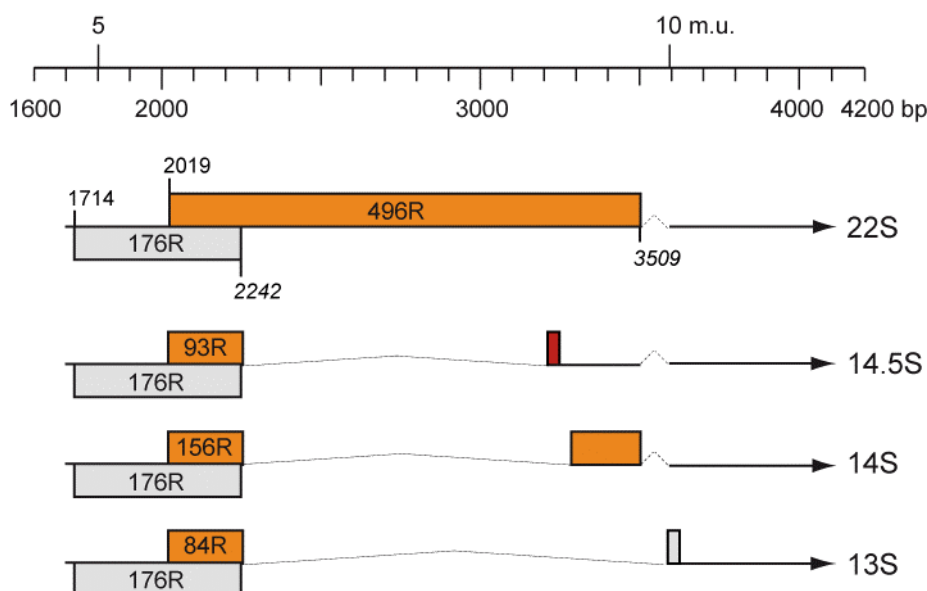


**Abb. 34 Northern Blot-Analyse**

(A) A549-Zellen wurden mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 10) und 48 h p.i. geerntet. Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht infiziert (mock). Es wurden je 1 µg zytoplasmatische (z) und nukleäre (n) mRNA über 1 %ige FA-Gele aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Der Nachweis der L4-RNA bzw. der Fiber (L5)-RNA erfolgte mit Digoxigenin-markierten RNA-Sonden. Die 18S rRNA-Bande wurde mit Hilfe von Methylenblaufärbung sichtbar gemacht und diente als interne Ladekontrolle. (B) Die Intensität der erhaltenen Banden der L4- bzw. der L5-RNA 48 h p.i. wurde mit der ImageJ-Software (Abramoff *et al.*, 2004) quantifiziert, mit Hilfe der 18S rRNA Werte korrigiert und graphisch dargestellt, wobei der mRNA-Level des Wildtypvirus als Referenzwert auf 1 normiert wurde. (C) Das Verhältnis der Gleichgewichtsmengen zytoplasmatischer zu nukleärer mRNA diente als Maß für die Exporteffizienz der einzelnen Virusmutanten.

## 5.5 Identifizierung und Charakterisierung von zwei neuen E1B-Isoformen

Die E1B-Region von Ad5 kodiert für mindestens fünf verschiedene Polypeptide, die als E1B-496R (E1B-55K), E1B-176R (E1B-19K), E1B-156R, E1B-93R und E1B-84R entsprechend ihrer AS-Länge bezeichnet werden. Die verschiedenen E1B-Transkripte werden durch alternatives Spleißen aus einer Vorläufer-RNA gebildet. Dabei bleibt die kodierende Sequenz von E1B-19K unverändert, während der offene Leserahmen von E1B-55K bei den verschiedenen Spleißvarianten verändert ist (Anderson *et al.*, 1984; Virtanen und Pettersson, 1985; Lewis und Anderson, 1987). In Abb. 35 sind die E1B-Region sowie die darin kodierten Genprodukte dargestellt.

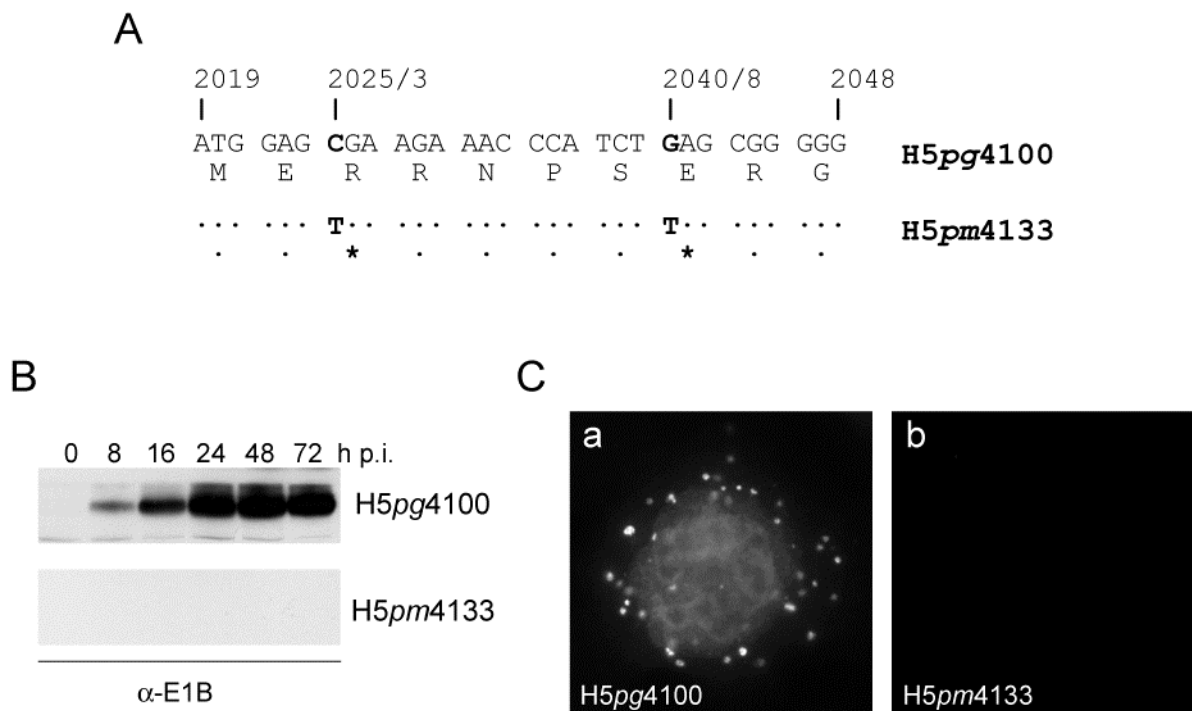


**Abb. 35 Die E1B-Region von Ad5**

Dargestellt ist das linke Ende des Genoms von Ad5. Die Nummern beziehen sich auf die Nukleotide bzw. auf die *map units* (m.u.) in der Ad5 Sequenz. Die Detailansicht zeigt die Länge der Vorläufer-RNA sowie die fünf verschiedenen mRNAs mit ihrem jeweiligen Spleißmuster. Dabei beziehen sich die Farben auf unterschiedlich benutzte offene Leserahmen. Die Proteinprodukte werden nach der Zahl ihrer AS-Reste benannt (496R, 176R, 156R, 93R und 84R). Die Zahlen der längsten mRNA (22S) geben die Positionen der Start- (1714 bei E1B-176R und 2019 bei E1B-496R) bzw. Stoppkodons (2242 bei E1B-176R und 3509 bei E1B-496R) an.

Da es sich bei der bisher verwendeten Deletionsmutante *dl1520* um eine Ad2/Ad5-Viruschimäre handelt (Barker und Berk, 1987), sollte eine E1B-Deletionsmutante im H5pg4100-Rückgrat hergestellt werden. Dazu wurden mit Hilfe des *QuikChange*<sup>TM</sup>

*Site-Directed Mutagenesis Kits* (Stratagene) zwei Nonsensekodons an Position drei und acht in den Leserahmen von E1B-55K eingefügt, die die Bildung von E1B-496R, sowie dessen Spleißprodukte (E1B-156R, E1B-93R und E1B-84R) verhindern. Die so veränderte E1-Box wurde wie unter 5.1 beschrieben in das pH5pg4100-Bacmid rückkloniert (Abb. 4) und die entstandene Virusmutante erhielt den Namen H5pm4133 (Abb. 36 A). Diese wurde zunächst auf die Expression von E1B-55K sowohl mittels *Western Blot* (Abb. 36 B) als auch mit Immunfluoreszenzanalysen (Abb. 36 C) getestet.

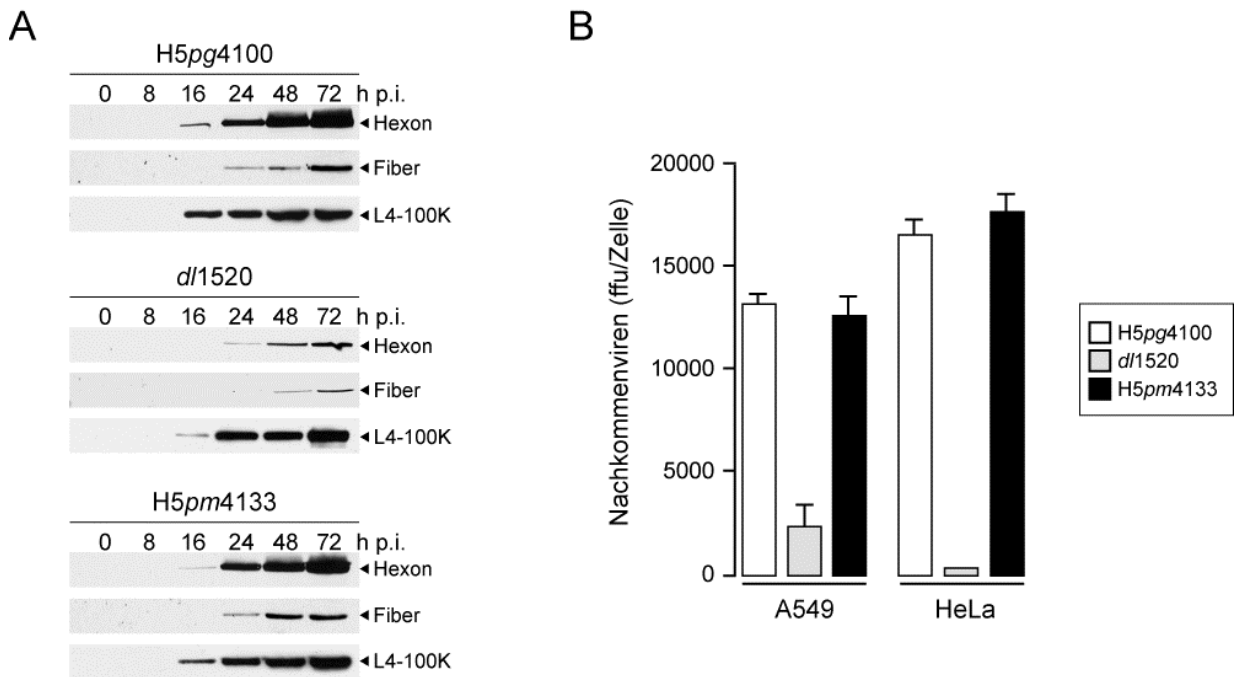


**Abb. 36 Sequenz der Deletionsmutante H5pm4133 und Überprüfung der Expression von E1B-55K**

(A) Dargestellt ist ein Sequenzausschnitt von Ad5 E1B-55K, der mit dem Nukleotid an Position 2019 des Ad5 Genoms bzw. der ersten AS von 55K beginnt. Markiert sind die Nukleotide, die in der Deletionsmutante H5pm4133 im Vergleich zum Wildtypvirus H5pg4100 ausgetauscht wurden (nt 2025 bzw. AS 3 und nt 2040 bzw. AS 8). Die Sterne beziehen sich auf die Verwendung eines der drei Stoppkodons, Punkte kennzeichnen jeweils gleiche nt bzw. AS. (B) A549-Zellen wurden mit dem Wildtypvirus und der Deletionsmutante infiziert (moi 20) und zu den angegebenen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet. Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht infiziert (mock). Es wurden je 20 µg Gesamtzellextrakt über 10 %ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt und mittels *Western Blot* auf Nitrozellulose transferiert. Der Nachweis erfolgte mit dem E1B-55K-spezifischen Maus-Antikörper 2A6. (C) A549-Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät und bei einer Konfluenz von 60 % mit den Viren infiziert. Die Zellen wurden 20 h p.i. mit Methanol fixiert und *in situ* mit dem E1B-spezifischen Antikörper 2A6 inkubiert. Die Detektion des Primäntikörpers erfolgte mit einem FITC-gekoppelten anti-Maus-Antikörper.

Wie erwartet konnte in Zellen, die mit H5pm4133 infiziert wurden kein E1B-55K-Protein im *Western Blot* (Abb. 36 B) und auch in der Immunfluoreszenz (Abb. 36 C; b) nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass die zwei Stoppkodons an Position 3 und 8 die Expression von E1B-55K verhindern.

Zur Kontrolle wurde als nächstes die Produktion später viraler Proteine und Nachkommenviren in infizierten A549- und HeLa-Zellen untersucht (Abb. 37 A und B).



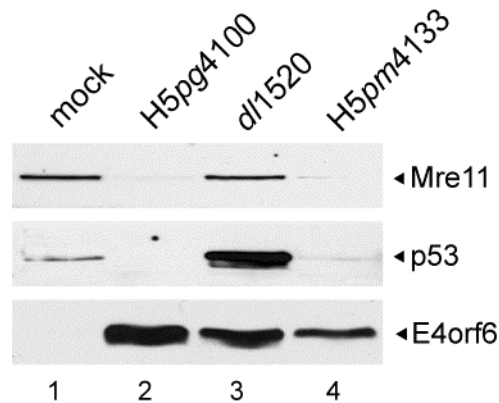
**Abb. 37 Analyse zur Produktion später viraler Proteine und Nachkommenviren**

(A) A549-Zellen wurden mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 20) und zu den angegebenen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet. Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht infiziert (mock). Es wurden je 20 µg Gesamtzelleextrakt über 10 %ige (für L4-100K) bzw. 12 %ige (für Strukturproteine) SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Antikörpern gegen L4-100K (6B10) und gegen die späten viralen Strukturproteine ( $\alpha$ -late) inkubiert. (B) Zur Bestimmung der Ausbeute an Nachkommenviren wurden HeLa- bzw. A549-Zellen mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 10) und 72 h p.i. geerntet. Aus den infizierten Zellen wurden die Nachkommenviren isoliert und anschließend auf 911-Zellen austitriert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

Überraschenderweise exprimierte die Virusmutante H5pm4133 fast die gleichen Mengen an späten Proteinen wie das Wildtypvirus H5pg4100 (Abb. 37 A). Auch die Produktion von Nachkommenviren war bei dieser Mutante im Vergleich zum wt nicht defekt (Abb. 37 B). Im Gegensatz dazu konnte die Deletionsmutante dl1520 nur

sehr ineffizient späte Strukturproteine und Nachkommenviren produzieren (Abb. 37 A und B).

Um zu testen ob die Mutante H5pm4133 sich auch beim Abbau von Mre11 und p53 ähnlich wie das Wildtypvirus verhält, wurden A549-Zellen infiziert, 48 h p.i. geerntet, aufgeschlossen und *Western Blot*-Analysen durchgeführt (Abb. 38).



**Abb. 38 Abbau von p53 und Mre11 in Ad-infizierten Zellen**

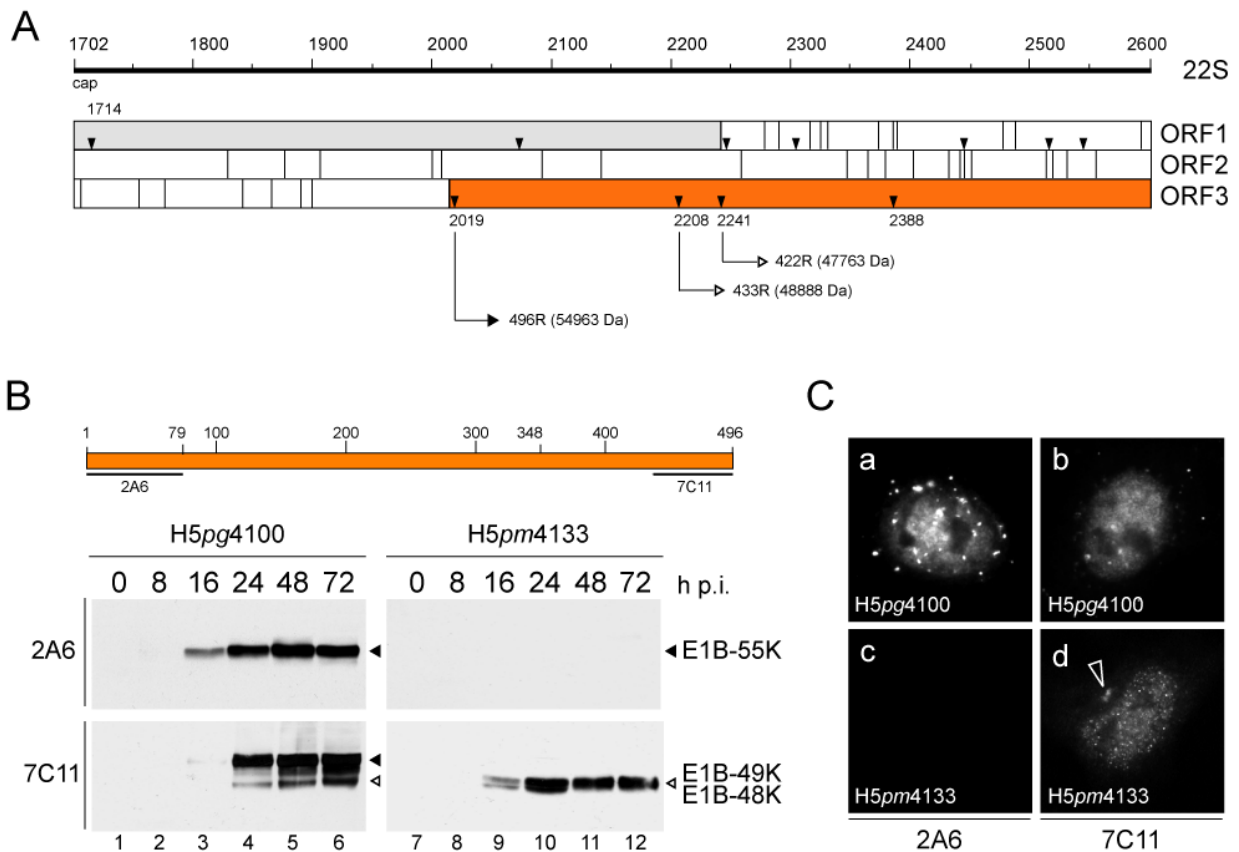
A549-Zellen wurden mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (moi 25) und 48 h p.i. geerntet. Es wurden jeweils 75 µg Gesamtzellextrakt über 12 %ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt, mittels *Western Blot* auf Nitrozellulose transferiert und mit Antikörpern gegen Mre11, p53 (DO-1) und E4orf6 (RSA3) inkubiert.

Die *Western Blot*-Daten zeigen, dass die Virusmutante H5pm4133, trotz reduzierter E4orf6-Gleichgewichtsmenge (Abb. 38, Spur 4) wie das Wildtypvirus in der Lage ist Mre11 und p53 dem proteasomalen Abbau zuzuführen (Abb. 38, Spuren 2 und 4). Dies und die Analysen zur Produktion von späten viralen Proteinen und Nachkommenviren stehen im Widerspruch zu Daten der Deletionsmutante dl1520, die weder Mre11 und p53 abbauen kann (Abb. 38, Spur 3), sowie schwere Defekte bei der Produktion später Kapsidproteine und Nachkommenviren aufwies (Abb. 37 A und B).

Da bekanntermaßen ein funktionelles E1B-Protein für diese Funktionen wichtig ist, deutet dies darauf hin, dass ein weiteres vermutlich mit E1B-55K verwandtes Protein exprimiert wird, das den Verlust von E1B-55K kompensieren kann. Um dies zu überprüfen, wurden die Leserahmen des E1B-Gens bis Nukleotidposition 2600 nach möglichen alternativen Startkodons untersucht (Abb. 39 A). Interessanterweise befin-

## ERGEBNISSE

den sich im orf des E1B-55K-Gens zwei weitere Startkodons an Position 2208 und 2241, die zur Bildung eines 433 AS (49K) bzw. eines 422 AS (48K) langen Polypeptids führen könnten. Ein weiteres Methionin befindet sich an Nukleotidposition 2388. Diese verkürzten Formen fehlen in der Deletionsmutante *dl1520*, weil diese neben dem Stoppkodon an AS-Position 3 noch eine 827 Bp lange Deletion (nt 2496 bis 3323) im orf des E1B-55K-Gens enthält (Barker und Berk, 1987). Da das Epitop des bisher verwendeten E1B-spezifischen Antikörpers 2A6 der Aminoterminus von 55K ist (AS 1 - 79; Sarnow *et al.*, 1982b), würde dieser Antikörper die verkürzten Formen von E1B nicht detektieren. Deshalb wurde die Expression von E1B erneut mit dem C-terminalen E1B-spezifischen Antikörper 7C11, untersucht (Abb. 39 B, C).



**Abb. 39 Darstellung der orfs von E1B-55K und Vergleich der Antikörper 2A6 und 7C11**

(A) Dargestellt ist der 5'-terminale Bereich der 22S-mRNA (nt 1702 bis nt 2600) von Ad5 E1B-55K. Darunter sind die drei verschiedenen orfs (ORF1 – ORF3) von E1B abgebildet, wobei die Sequenz von E1B-19K (E1B-176R) grau und die von E1B-55K (E1B-496R) orange hinterlegt ist. Alle Startkodons bzw. Methionine (ATG) werden durch Pfeilspitzen markiert, die Querstriche geben die Lage der Stoppkodons an. (B) Im oberen Abschnitt ist das 496 AS lange E1B-55K-Protein mit den Epitopen der E1B-spezifischen Antikörper 2A6 und 7C11 schematisch dargestellt. Darunter befinden sich die *Western Blot*-Analysen zum Vergleich der Antikörper 2A6 und 7C11. Dazu wurden A549-Zellen mit

der Deletionsmutante und dem Wildtypvirus infiziert (moi 20) und zu den angegebenen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet. Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht infiziert (mock). Es wurden gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (25 µg bei 2A6 und 50 µg bei 7C11) über 10 %ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt und mittels *Western Blot* auf Nitrozellulose transferiert. Der Nachweis erfolgte mit den E1B-55K-spezifischen Antikörpern 2A6 bzw. 7C11. Die Expositionszeit der Spuren 7 – 12 war doppelt so lang wie die der Spuren 1 – 6. (C) A549-Zellen wurden auf Deckgläser ausgesät und bei einer Konfluenz von 60 % mit den Viren infiziert. Die Zellen wurden 20 h p.i. mit PFA fixiert und *in situ* mit den E1B-spezifischen Antikörper 2A6 (a und c) bzw. 7C11 (b und d) inkubiert. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte mit einem FITC-gekoppelten anti-Maus (2A6)- bzw. einem FITC-gekoppelten anti-Ratte (7C11)-Antikörper.

Die *Western Blot*-Analysen mit dem 7C11-Antikörper zeigen, dass tatsächlich zwei verkürzte Formen von E1B entstehen, die mit dem Antikörper 2A6 nicht detektiert werden können (Abb. 39 B). Da diese verkürzten Formen knapp unter der 50K-Markerbande laufen, handelt es sich vermutlich um die Polypeptide, die mit dem Startkodon an Position 2208 bzw. 2241 beginnen und ca. 49K (433 AS) bzw. 48K (422 AS) groß sind. Diese verkürzten E1B-Formen werden auch im Wildtypvirus hergestellt (Abb. 39 B, Spuren 2 – 6).

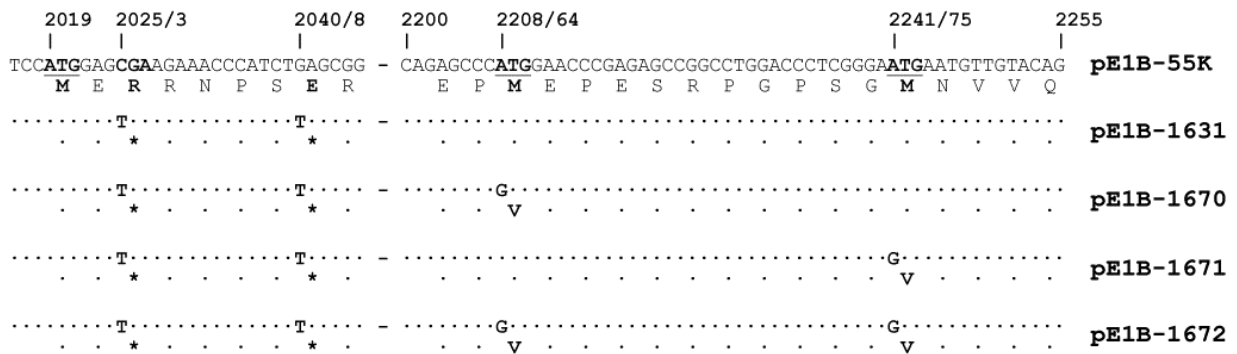
Mit Hilfe des 7C11-Antikörpers konnten die verkürzten Formen auch in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 39 C). E1B-48K und/oder E1B-49K sind überwiegend diffus im Zellkern verteilt. Ein kleiner Teil befindet sich auch in der Nähe des Zellkerns im Zytoplasma (markiert mit Pfeil in Abb. 39 C; d). Wie schon in den *Western Blot*-Analysen sind dabei die Gleichgewichtsmengen der verkürzten Formen im Vergleich zum E1B-55K-Protein sehr gering. Trotzdem reichen diese niedrigen Mengen an verkürztem E1B aus, um die virale Replikation vollständig zu unterstützen (Abb. 37) und die zellulären Proteine p53 und Mre11 dem proteasomalen Abbau zuzuführen (Abb. 38).

Um zu überprüfen, ob die verkürzten Formen auch in transienten Transfektionsexperimenten hergestellt werden und ob es einen Unterschied in der Expression von E1B-48K und E1B-49K gibt, wurden Plasmide hergestellt, die sowohl die beiden Stopps an AS-Position 3 und 8 tragen als auch das ATG an Position 2208 bzw. 2241 mutiert ist (Abb. 40 A). Die Herstellung dieser E1B-Punktmutanten erfolgte mit Hilfe des *QuikChange<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kits* (Stratagene). Als Matrize diente pcDNA3-E1B-55K (pE1B-55K) bzw. pE1B-1631, bei dem analog zur Virusmutante

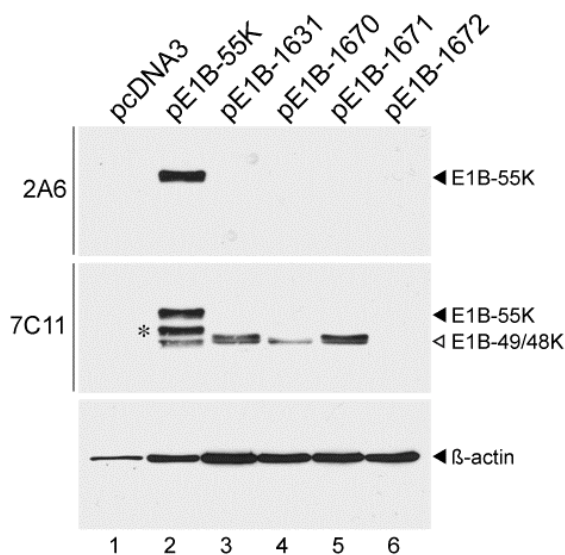
## ERGEBNISSE

H5pm4133 die dritte und achte AS durch Stoppkodons ersetzt sind. Die Plasmide wurden nach ihrer Nummer in der Datenbank der Arbeitsgruppe benannt. Bei dem Plasmid pE1B-1670 ist zusätzlich zu den Stopps das Methionin an Position 64 zu Valin (pE1B-M64V) mutiert, bei pE1B-1671 das Methionin an Position 75 (pE1B-M75V). pE1B-1672 ist eine Doppelmutante, bei der neben den beiden Stopps sowohl das Methionin an Position 64 als auch an Position 75 in Valin (pE1B-M64V/M75V) umgewandelt wurde (Abb. 40 A). Als erstes wurde die Expression der verschiedenen Plasmide nach Transfektion in H1299-Zellen untersucht (Abb. 40 B).

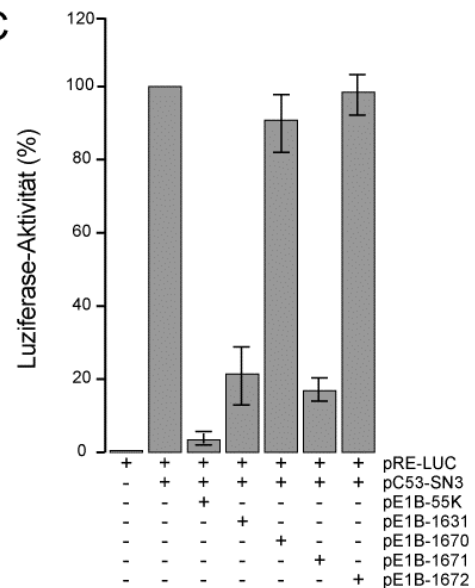
**A**



**B**



**C**



**Abb. 40 Einfluss der verkürzten E1B-Isoformen auf die p53-abhängige Transkriptionsaktivierung**

(A) Dargestellt ist ein Sequenzausschnitt von Ad5 E1B-55K. Markiert sind die Nukleotide, die in den Plasmiden pE1B-1631, pE1B-1670, pE1B-1671 und pE1B-1672 im Vergleich zum Wildtypprotein ausgetauscht wurden (nt 2025 bzw. AS 3, nt 2040 bzw. AS 8, nt 2208 bzw. AS 64 und nt 2241 bzw. AS 75). Die Sterne beziehen sich auf die Verwendung eines der drei Stoppkodons, Punkte kennzeichnen



jeweils gleiche nt bzw. AS. (B) Nachweis der verschiedenen Plasmide nach Transfektion. Dazu wurden H1299-Zellen mit 5 µg der verschiedenen Plasmide transfiziert und nach 48 h geerntet. Der leere Vektor pcDNA3 diente als Kontrolle. Es wurden gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (50 µg bei 2A6 und β-actin; 100 µg bei 7C11) über 10 %ige SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mittels *Western Blot* auf Nitrozellulose transferiert. Der Nachweis erfolgte mit den E1B-55K-spezifischen Antikörpern 2A6 bzw. 7C11. Der Nachweis des β-actin-Proteins durch AC-15 diente als Ladekontrolle. (C)  $2 \times 10^5$  H1299-Zellen wurden in 6-well Schalen ausgesät und am nächsten Tag mit pRL-TK (interne Kontrolle), pRE-LUC, pC53-SN3 (pCMV-p53) und pcDNA3 (Vektor) bzw. pE1B-Plasmiden transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit Lyse-Puffer aufgeschlossen und die Aktivität der *Firefly*-Luziferase in den Transfektionsansätzen mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) bestimmt. Die Aktivität der *Firefly*-Luziferase in Gegenwart von Wildtyp p53 (pC53-SN3) wurde als Referenzwert auf 100% normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

Die *Western Blot*-Analysen ergaben, dass die verkürzten Formen von E1B nur mit dem Antikörper 7C11 nachgewiesen werden können. Der 2A6-Antikörper erkennt nur das Volllänge-E1B-Protein. In pE1B-55K-transfizierten Zellen konnten mit dem 7C11-Antikörper drei Banden detektiert werden. Dabei entspricht die oberste Bande dem Volllänge E1B-55K, die unterste Bande vermutlich den E1B-48K/49K-Isoformen. Die molekulare Ursache für die mittlere ca. 50K großen Bande (Abb. 40 B, Spur 2; Stern) ist bisher noch unklar. Nach Transfektion von pE1B-1631 kann man wie erwartet eine Doppelbande (E1B-48K und E1B-49K) detektieren (Abb. 40 B, Spur 3). In Zellen, die mit pE1B-1671 transfiziert wurden, wird nur das kürzere E1B-48K-Protein gebildet (Abb. 40 B, Spur 4). Interessanterweise konnte in pE1B-1671-transfizierten Zellen eine Doppelbande nachgewiesen werden. Da nur die längere 49K-Isoform exprimiert werden kann, könnte es sich hierbei um eine posttranslational modifizierte z. B. phosphorylierte Form, des E1B-49K-Proteins handeln (Abb. 40 B, Spur 5). Die Mutation beider ATGs (AS-Position 64 und 75) führt zu einem vollständigen Verlust jeglicher E1B-Formen (Abb. 40 B, Spur 6).

Eine wichtige Aufgabe von E1B-55K ist es, die transaktivierende Funktion von p53 zu hemmen (Yew und Berk, 1992; Teodoro und Branton, 1997). Dabei ist E1B-55K in der Lage über zwei zentrale Bereiche direkt an die N-terminale Domäne von p53 zu binden und dadurch die Transaktivierung p53-regulierter Gene zu inhibieren (Sarnow *et al.*, 1982a; Kao *et al.*, 1990; Yew *et al.*, 1990; Shen *et al.*, 2001).

Um zu überprüfen, ob die verkürzten E1B-Isoformen noch in der Lage sind, die p53-

vermittelte Transkriptionsaktivierung zu reprimieren, wurden wie unter 4.7 beschrieben p53-negative H1299-Zellen mit dem Plasmid pRE-LUC, das die *Firefly*-Luziferase (LUC) unter der Kontrolle eines p53-abhängigen Promotors (pRE) exprimiert, einem konstitutiv p53-exprimierenden Plasmid (pC53-SN3) und den verschiedenen E1B-Plasmiden bzw. der Vektorkontrolle transfiziert. Die Aktivität der *Firefly*-Luziferase wurde nach 48 h luminometrisch bestimmt und die Messwerte mit der internen Kontrolle (*Renilla*-Luziferase) normalisiert (Abb. 37 C).

Die Auswertung der Versuche zeigte, dass das E1B-55K-Wildtypprotein die p53-vermittelte Transkriptionsaktivierung fast vollständig inhibieren konnte (Abb. 40 C). Unter den gewählten Bedingungen wurden Restaktivitäten von etwa 2% im Vergleich zum Kontrollansatz ohne pE1B-55K ermittelt. Das pE1B-1631-Plasmid war mit ca. 25 % *Firefly*-Luziferaseaktivität ebenfalls noch deutlich in der Lage die Transkriptionsrate des Reportergens zu inhibieren. Auch die 49K-Isoform zeigte mit einer Restaktivität von 20 % eine zu pE1B-1631 vergleichbar starke Inhibition. Die im Vergleich zum E1B-55K-Protein reduzierte Inhibition könnte auf die geringeren E1B-Gleichgewichtsmengen der verkürzten Isoformen zurückzuführen sein (Abb. 40 B). Die Expression von E1B-48K hingegen führt zu einem fast vollständigen Verlust der p53-Repression. Dies könnte mit dem stark reduzierten *steady-state* Level dieses Proteins in Zusammenhang stehen. Es wäre jedoch auch möglich, dass zwischen AS 64 und 75 eine für die Inhibition der p53-stimulierten Transkription wichtige Funktion des E1B-Proteins kodiert ist.

Zusammenfassend zeigen die Daten des letzten Teils dieser Arbeit, dass neben den bisher bekannten E1B-Proteinen zwei weitere N-terminal verkürzte Isoformen – E1B-48K und E1B-49K - gebildet werden, die trotz ihrer geringen Gleichgewichtsmengen die virale Replikation vollständig unterstützen können.

## 6 Diskussion

---

### 6.1 Funktionen von E1B-55K und E4orf6 während der produktiven Infektion

Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, dass das E1B-55K-Protein von Ad5 ein multifunktionelles Polypeptid ist, das viele wichtige Funktionen während der Virusreplikation hat.

In der frühen Phase bindet E1B an das Tumorsuppressorprotein p53 und inhibiert den p53-induzierten Wachstumsstopp und die Apoptose. Dabei reprimiert E1B die Transaktivierung p53-abhängiger Promotoren (Sarnow *et al.*, 1982a; Kao *et al.*, 1990; Yew *et al.*, 1990; Yew und Berk, 1992; Yew *et al.*, 1994; Martin und Berk, 1998; Shen *et al.*, 2001) und dirigiert in Kombination mit E4orf6 p53, sowie Mre11, ein Bestandteil des zellulären DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturkomplexes in den Ubiquitin-abhängigen proteolytischen Abbauweg (Querido *et al.*, 2001a; Harada *et al.*, 2002; Blanchette *et al.*, 2004).

In der späten Phase der Virusinfektion reguliert das E1B-55K-Protein im Komplex mit E4orf6 im Verlauf des sogenannten *host shut-off* den Export viraler mRNAs vom Kern ins Zytoplasma und die effiziente Synthese später viraler Genprodukte (zur Übersicht: Dobner und Kzhyshkowska, 2001; Flint und Gonzalez, 2003).

#### 6.1.1 Die Konjugation mit SUMO1 reguliert die subnukleäre Lokalisation und einen CRM1-unabhängigen Exportweg von E1B-55K

Frühere Transfektions- und Heterokaryon-Experimente ergaben, dass das NES und die SUMO1-Modifikation des E1B-55K-Proteins wichtig für dessen Pendelaktivität sind. Dabei ist die Bindung des Exportrezeptors CRM1 an das Leucin-reiche NES von E1B für den Kernexport des adenoviralen Proteins verantwortlich (Krätzer *et al.*, 2000; Dosch *et al.*, 2001). Die Modifikation mit SUMO1 ist sowohl für die nukleäre

Akkumulation von E1B als auch für die Steuerung zu spezifischen Regionen innerhalb des Zellkerns essenziell (Endter *et al.*, 2001; Endter, 2002).

Die Immunfluoreszenzanalysen dieser Arbeit zeigen ebenfalls, dass das NES und die SUMO1-Modifikation auch in virusinfizierten Zellen die Lokalisation des E1B-55K-Proteins beeinflussen (5.2.2). Virusmutanten, deren SKM mutiert wurde (H5pm4102) zeigen im Vergleich zum Wildtypvirus keine gravierenden Unterschiede in der Lokalisation von E1B-55K sowohl in der Immunfluoreszenz (Abb. 8) als auch in der subzellulären Fraktionierung (Abb. 7). Im Gegensatz dazu führt die Mutation des NES in der Virusmutante H5pm4101 zu einer stark veränderten Lokalisation des E1B-Proteins. Schon durch die subzelluläre Fraktionierung wird deutlich, dass das E1B-NES-Protein im Kern akkumuliert und zwar am stärksten in der löslichen Kernfraktion (F3) und der Chromatinfraktion (F4). Die Immunfluoreszenzanalysen zeigen, dass sowohl in HeLa- als auch in A549-Zellen die Mutationen im NES den CRM1-abhängigen nukleären Export des E1B-55K-Proteins verhindern und es zu einer Akkumulation von E1B-55K im Zellkern kommt (Abb. 8, d). Dies deutet zunächst darauf hin, dass das NES allein ausreicht, um den Transport des E1B-55K-Proteins vom Zellkern ins Zytoplasma zu veranlassen. Das E1B-Protein der NES/SKM-Doppelmutante H5pm4103 ist jedoch nicht bevorzugt im Kern lokalisiert, vielmehr ist 55K hier ähnlich wie das Wildtypprotein, diffus im Kern und im Zytoplasma verteilt. Außerdem aggregiert es an mehreren zytoplasmatischen Strukturen. Ähnliches kann man beobachten, wenn man Zellen, die mit SKM-Virusmutanten (H5pm4102 und H5pm4103) infiziert wurden mit dem CRM1-Inhibitor LMB behandelt. Auch hier kommt es zu keiner nukleären Akkumulation von E1B-55K, wohingegen das Wildtypprotein nach LMB-Behandlung fast ausschließlich im Kern lokalisiert ist (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen können auf verschiedene Weise erklärt werden. Da das NES und das SKM im E1B-55K-Protein nur wenige AS voneinander entfernt sind, könnte es sein, dass die Mutation des SKM zu einer Konformationsänderung des E1B-Proteins führt, und dies die Bindung an CRM1 verhindert. Die andere Möglichkeit ist, dass E1B-55K nicht nur über einen CRM1-abhängigen Weg aus dem Kern exportiert werden kann, sondern auch über einen bisher unbekanntem CRM1-unabhängigen

---

Weg. Die Daten dieser Arbeit zeigen zum ersten Mal, dass dieser CRM1-unabhängige Exportweg vermutlich über die Modifikation mit SUMO1 negativ reguliert wird. Dies bedeutet, dass die Konjugation von SUMO1 in virusinfizierten Zellen nicht wie zunächst angenommen nur für den Kernimport zuständig ist, sondern dass eine erhöhte SUMOylierung von E1B zu einer Retention des adenoviralen Proteins im Kern führt. Da die Mutation des NES eine vermehrte SUMO1-Modifikation des E1B-Proteins bewirkt (Abb. 6), wäre dies neben dem Verlust des CRM1-abhängigen Exports eine Erklärung für die starke Akkumulation des E1B-Proteins im Kern.

Diese Annahme wird durch Untersuchungen des Transkriptionskorepressor CtBP (*C-terminal binding protein of adenovirus E1A*) unterstützt. CtBP ist ein normalerweise nukleäres Protein das SUMOyliert werden kann. Die Inhibition der SUMO1-Modifikation führt zu dessen zytoplasmatischer Akkumulation (Lin *et al.*, 2003). Die E1-Proteine von BPV (bovines Papillomavirus) und HPV-11 (humanes Papillomavirus Typ 11) werden ebenfalls SUMOyliert, was für deren intranukleäre Lokalisation erforderlich ist (Rangasamy *et al.*, 2000; Rosas-Acosta *et al.*, 2005). Da das E1B-55K-NES-Protein im Kern v. a. an den viralen Transkriptions- und Replikationszentren lokalisiert, die vermutlich der F5-Fraktion bei der subzellulären Fraktionierung entsprechen (Leppard und Shenk, 1989) wäre es zudem möglich, dass die Modifikation mit SUMO1 die intranukleäre Lokalisation von Ad5 E1B beeinflusst. In Wildtyp-virus-infizierten Zellen, in denen nur sehr wenig SUMO1-E1B vorhanden ist, befindet sich das E1B-Protein nur in einem geringen Prozentsatz der Zellen an den viralen Replikationszentren. Im Gegensatz dazu lokalisiert in Zellen, die mit der Deletionsmutante H5dl355 infiziert wurden, mehr E1B im Kern und zwar verstärkt an den viralen Replikations- und Transkriptionszentren. Dies ist konsistent mit Daten von Lethbridge und Mitarbeitern, die zeigen, dass in Abwesenheit von E4orf6 eine erhöhte SUMO1-Modifikation von E1B beobachtet werden kann und dies bevorzugt mit der nukleären Matrix assoziiert ist (Lethbridge *et al.*, 2003). Auch in E4orf6-NES (H5pm4116)-infizierten Zellen befindet sich das E1B-Protein verstärkt im Kern in subnukleären Aggregaten (Abb. 18 A; n). Da die Mutation im E4orf6-NES zu einer verringerten Stabilität von E4orf6 führt, wäre es möglich, dass auch hier das E1B-Protein

stärker SUMOyliert wird und dies der Grund für die veränderte Lokalisation ist.

Zusammenfassend könnte dies bedeuten, dass die Modifikation mit SUMO1 einen positiven Effekt auf die E1B-55K Protein-Protein-Wechselwirkung hat und somit die Assemblierung von E1B-Multiproteinkomplexen fördert.

Ein ähnlicher Effekt wurde für das PML-Protein beschrieben. Hier spielt die Modifikation von PML mit SUMO1 eine essenzielle Rolle bei der PML-NB Bildung bzw. bei der Rekrutierung von weiteren PML-NB-Komponenten (Kamitani *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1998; Duprez *et al.*, 1999; Ishov *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 2000; Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2001). Eine andere Erklärung für die Nicht-Lokalisation der SKM-Mutanten an den Replikationszentren wäre, dass diese Lokalisation nur sehr transient ist. Falls E1B-55K SUMO1-modifiziert werden kann und dies den Export des adenoviralen Proteins negativ reguliert, könnte es sein, dass SUMO1-E1B im Kern festgehalten wird und zwar an den Replikationszentren. Kann es jedoch nicht SUMOyliert werden, verlässt es sofort die Replikationszentren und den Kern. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die Modifikation von E1B-55K mit SUMO1 zum einen für die intranukleäre Steuerung/Aggregation an bestimmten Strukturen wichtig ist, zum anderen dass SUMO1 vermutlich den CRM1-unabhängigen Export von E1B negativ regulieren kann.

Trotz der wichtigen Rolle, die die SUMO1-Modifikation für E1B-55K spielt, ist die Menge an SUMO1-modifiziertem E1B im Vergleich zu nicht-modifiziertem jedoch sehr gering. Dies ist ein Paradoxon, das sehr häufig bei Untersuchungen an SUMO1-modifizierten Proteinen auftritt (zur Übersicht: Melchior, 2000; Johnson, 2004; Hay, 2005). Eine mögliche Erklärung wäre, dass ein ständiger Zyklus an SUMO1-Konjugation und -Dekonjugation stattfindet, bzw. dass die SUMO1-Dekonjugation mindestens genauso schnell stattfindet wie die Konjugation, und deshalb die Gleichgewichtsmenge an SUMOylierten Proteinen sehr gering ist (Zhang *et al.*, 2002; Boggio *et al.*, 2004). In dem von Johnson und Hay vorgeschlagenen Modell fördert die SUMOylierung ein bestimmtes Ereignis, dessen Konsequenzen auch noch nach der SUMO1-Dekonjugation weiter bestehen. Dies würde bedeuten, dass SUMO1 das Schicksal des Proteins auch dann noch beeinflusst, wenn es schon längst dekonjugiert

---

ist (Johnson, 2004; Hay, 2005).

### **6.1.2 Die CRM1- und SUMO1-regulierte Exportfunktion von E1B-55K steuert nicht den Kerntransport später viraler mRNAs**

Das E1B-55K-Protein spielt bekanntermaßen eine wichtige Rolle bei der viralen Replikation, wobei das E1B-Protein die meisten seiner Funktionen vor allem in der späten Phase des Infektionszyklus erfüllt. Die frühe und die späte Phase des produktiven Infektionszyklus sind durch das Einsetzen der viralen DNA-Synthese getrennt. Es konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Virusmutanten, einschließlich der E1B-Deletionsmutante *dl1520* etwa die gleiche Menge an viraler DNA wie das Wildtypvirus H5pg4100 bildeten. Auch die Initiation der viralen DNA-Synthese fand bei allen Virusmutanten etwa zur selben Zeit statt (5.2.3). Dies deutet, zusammen mit früheren Untersuchungen (Goodrum und Ornelles, 1997; Goodrum und Ornelles, 1998) darauf hin, dass das E1B-55K-Protein seine für die virale Replikation entscheidenden Funktionen erst nach dem Einsetzen der viralen DNA-Synthese in der späten Phase des Replikationszyklus ausübt. Adenovirus-Mutanten, die kein funktionsfähiges E1B-Protein exprimieren, zeigen erhebliche Defekte beim *host shut-off*, bei der Synthese viraler Strukturproteine und bei der Produktion von Nachkommenviren (Babiss *et al.*, 1985; Pilder *et al.*, 1986a; Pilder *et al.*, 1986b; Yew *et al.*, 1990). Ein Grund dieser Defekte ist das Unvermögen der E1B-deletierten Mutanten, in der späten Phase der Infektion den selektiven Transport viraler mRNA vom Kern ins Zytoplasma zu fördern (Pilder *et al.*, 1986a; Leppard und Shenk, 1989). Da sich das E1B-55K-Protein zwischen Zellkern und Zytoplasma bewegen kann, nimmt man an, dass diese Pendelaktivität eine zentrale Rolle beim viralen mRNA-Transport spielt. Mit Hilfe der Virusmutanten H5pm4101, H5pm4102 und H5pm4103 wurde untersucht, welchen Einfluss das NES und die SUMO1-Modifikation auf die virale Replikation haben. Es konnte jedoch kein Effekt auf die Synthese später viraler Strukturproteine (Abb. 12) und die Produktion von Nachkommenviren (Abb. 13) festgestellt werden.

Überraschenderweise zeigte die SKM-Mutante H5pm4102 eine im Vergleich zum Wildtypvirus doppelt so hohe Exporteffizienz für L5-Transkripte (Abb. 14 C). Dies

---

stimmt mit dem vorher beschriebenen Modell überein, dass die Modifikation mit SUMO1 den Export von E1B negativ reguliert. Kann E1B-55K nicht mehr SUMO1-modifiziert werden, führt dies zu einem verstärkten nukleären Export des adenoviralen Proteins und somit vermutlich auch zu einem verstärkten Export der L5-mRNA. L4-Transkripte sind davon nicht betroffen. Dies steht in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen, die zeigen, dass die verschiedenen späten Transkripte unterschiedlich stark von E1B abhängig sind, wobei gilt: L5 > L3 > L4 (Pilder *et al.*, 1986b; Leppard und Shenk, 1989; Gonzalez und Flint, 2002). Da in der E1B-NES-Mutante, die hauptsächlich im Kern lokalisiert ist, kein Defekt beim viralen mRNA-Transport festgestellt werden konnte, zeigt dies, dass die geringe Menge an E1B-55K, die sich bei dieser Mutante im Zytoplasma befindet für die Ausübung der Funktionen des Proteins in dem jeweiligen Kompartiment ausreichend ist. Dies ist konsistent mit Untersuchungen an der Virusmutante H5 $\rho$ m4133, die nur sehr geringe Mengen an N-terminal verkürztem E1B herstellen kann, jedoch die virale Replikation wie das Wildtypvirus unterstützt (Abb. 37).

Im Ganzen zeigen diese Ergebnisse, dass die SUMO1-abhängige Akkumulation von E1B-55K an den viralen Replikations- und Transkriptionszentren und der CRM1-vermittelte nukleäre Export des adenoviralen Proteins nicht für den effizienten nukleären Export später viraler mRNA, für die späte virale Proteinsynthese sowie die Produktion von Nachkommenviren in den getesteten Zelllinien benötigt wird. Vielmehr führt die Inhibition der SUMO1-Konjugation zu einem verstärkten Export von E1B und somit zu einem gesteigerten Export E1B-abhängiger später viraler mRNA.

### **6.1.3 Die CRM1-abhängige Exportfunktion von E1B-55K und E4orf6 ist nicht wichtig für den Transport später viraler mRNAs**

Auch das adenovirale Protein E4orf6 ist ein multifunktionelles Protein, das wie E1B-55K für die Expression später viraler Gene, für das Abschalten der zellulären Proteinsynthese, sowie für die Produktion von Nachkommenviren wichtig ist (Halbert *et al.*, 1985; Weinberg und Ketner, 1986; Huang und Hearing, 1989; Bridge und Ketner,



---

1990). Zudem erhöht das E4orf6-Protein die Stabilität der späten viralen mRNAs im Zellkern (Bridge und Ketner, 1989; Sandler und Ketner, 1989). Virusmutanten, die kein funktionelles E4orf6-Protein exprimieren, weisen einen ähnlichen Phänotyp wie E1B-deletierte Viren auf (Halbert *et al.*, 1985; Sandler und Ketner, 1991). Das E4orf6-Protein besitzt wie E1B-55K ein NES und zusätzlich ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS), die den Kernexport und -import von E4orf6 ermöglichen (Dobbelstein *et al.*, 1997). Mit Hilfe von kombinierten Transfektions-/Infektionsversuchen konnte gezeigt werden, dass Mutationen im E4orf6-NES zu einer verminderten Produktion von Hexonproteinen und viralen Nachkommen führen (Weigel und Dobbelstein, 2000). Es gibt jedoch widersprüchliche Aussagen über die Funktionalität des E4orf6-NES (Dobbelstein *et al.*, 1997; Krätzer *et al.*, 2000; Weigel und Dobbelstein, 2000). Da E1B-55K und E4orf6 interagieren (Sarnow *et al.*, 1984), wurde angenommen, dass dieser Proteinkomplex für den nukleozytoplasmatischen Transport viraler mRNAs zuständig ist (Babiss *et al.*, 1985; Halbert *et al.*, 1985; Pilder *et al.*, 1986a; Pilder *et al.*, 1986b; Cutt *et al.*, 1987; Huang und Hearing, 1989; Bridge und Ketner, 1990). Demzufolge könnte das E4orf6-Protein den Verlust des NES von E1B-55K kompensieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Mutationen im NES von E4orf6 zu einem im Vergleich zum Wildtypvirus leicht verringerten Export später viraler mRNAs (Abb. 22), zu einer verzögerten Synthese später viraler Proteine (Abb. 20), sowie zu einer leicht verringerten Produktion von Nachkommenviren (Abb. 21) führen. Diese Defekte können jedoch nicht mit einer geringeren viralen DNA-Akkumulation erklärt werden (Abb. 19). Da die Defekte bei der Doppel-NES-Virusmutante H5pm4119 nicht stärker ausgeprägt sind als bei der E4orf6-NES-Virusmutante H5pm4116, kann man diese ausschließlich auf den Verlust des E4orf6-NES zurückführen. Die Mutationen im NES von E4orf6 reduzieren jedoch die Gleichgewichtsmenge des adenoviralen Proteins drastisch (Abb. 17 B und 27 B). Deshalb besteht die Möglichkeit, dass dies der Grund für den leichten Defekt ist. Zudem ist die Wechselwirkung zwischen E1B-55K und den E4orf6-NES-Proteinen stark abgeschwächt (Abb. 27 B). Ob jedoch diese Interaktion wichtig für die

---

Funktionen des E1B/E4orf6-Komplexes ist, ist noch unklar (Bridge und Ketner, 1990; Shen *et al.*, 2001; Gonzalez und Flint, 2002; Blanchette *et al.*, 2004). Auch bei den verkürzten E1B-Isoformen ist die E4orf6-Gleichgewichtsmenge stark reduziert (Abb. 38). Trotzdem sind diese verkürzten E1B-Proteine wie das Wildtypvirus in der Lage, die virale Replikation zu unterstützen (Abb. 37). Es wäre daher möglich, dass die Mutation des NES in E4orf6 weitere Funktionen des adenoviralen Proteins beeinträchtigen und es deshalb zu den leichten Defekten während der viralen Replikation kommt.

Wenn der CRM1-vermittelte Export jedoch der einzige Exportweg für virale mRNAs wäre, würde man erwarten, dass der Defekt bei der Doppel-NES-Mutante H5 $\mu$ m4119 viel stärker ausgeprägt ist. Somit ist der NES-abhängige Export sehr wahrscheinlich nicht der Exportweg später viraler mRNAs. Dies ist konsistent mit neueren Untersuchungen, die zeigen, dass die Inhibition des CRM1-abhängigen Exports mit Leptomycin B (LMB) in infizierten Zellen ebenfalls nur einen geringen Einfluss auf die Synthese später viraler Proteine hat (Carter *et al.*, 2003). Auch die Verwendung von Peptid-Inhibitoren gegen den Exportrezeptor CRM1 führt zu keiner Verringerung des nukleären Exports viraler Fiber- und Penton-mRNA in infizierten Zellen (Flint *et al.*, 2005).

## **6.2 Der Transport später viraler mRNAs wird vermutlich über einen CRM1-unabhängigen Exportweg vermittelt**

Um ein besseres Verständnis des Exports später adenoviraler mRNAs zu erlangen, wurde nach neuen zellulären Interaktionspartnern von E1B-55K gesucht, die mögliche Funktionen während des RNA-Transports erfüllen könnten. Dabei konnte erstmalig die Bindung von APRIL an E1B-55K gezeigt werden (Abb. 23). APRIL gehört wie pp32 zur Familie der sauren nukleären Proteine (ANP32, *acidic nuclear proteins*), die durch mehrere aminoterminal Leucin-reiche Sequenzwiederholungen (LRR, *leucine-rich repeat*) und einen sauren Carboxyterminus charakterisiert werden können. Mitglieder der ANP32 Familie spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen zellulären

---

Prozessen, wie Signaltransduktion, Differenzierung, Proliferation und Apoptose (Matilla und Radrizzani, 2005). Zudem können pp32 und APRIL als Liganden für HuR fungieren, einem RNA-bindenden Protein, das die Stabilität und den Export von RNAs mit AU-reichen Elementen (ARE) reguliert (Ma *et al.*, 1996; Mencinger *et al.*, 1998; Brennan und Steitz, 2001). Sowohl HuR, als auch pp32 und APRIL können zwischen Kern und Zytoplasma pendeln. Dabei spielt bei pp32 und APRIL ein eigenständiges Leucin-reiches NES eine wichtige Rolle (Brennan *et al.*, 2000). HuR hingegen wird mit Hilfe seiner *Shuttle*-Domäne HNS (*HuR nucleocytoplasmic shuttling*) über einen CRM1-unabhängigen Weg exportiert (Fan und Steitz, 1998; Gallouzi und Steitz, 2001). Da viele Stress-induzierte RNAs AREs besitzen und zudem die Bindung von HuR an die, nach Hitzeschock aktivierte hsp70-RNA (*heat-shock protein 70*) nachgewiesen wurde, wäre es möglich, dass HuR der Exportadapter für Hitzeschock-Transkripte ist (Gallouzi *et al.*, 2001; Gallouzi und Steitz, 2001).

Die zelluläre Antwort auf einen Hitzeschock ähnelt der späten Phase einer Ad-Infektion, so werden z. B. während eines Hitzeschocks der Export und die Translation der meisten zellulären Transkripte verhindert, während spezielle Hitzeschock-mRNAs noch aus dem Kern transportiert und translatiert werden (Moore *et al.*, 1987; Yang *et al.*, 1996). Dies deutet darauf hin, dass späte virale und Hitzeschock-mRNAs über einen gemeinsamen molekularen Mechanismus exportiert werden. Neueste Untersuchungen zeigten, dass das nukleäre Phosphoprotein pp32 mit E4orf6 wechselwirkt und dies zur Stabilisierung und zum CRM1-unabhängigen Export von ARE-mRNAs zusammen mit p32 und HuR ins Zytoplasma führt (Higashino *et al.*, 2005). Die Interaktion zwischen E4orf6 und pp32 konnte in dieser Arbeit für alle untersuchten Virusmutanten bestätigt werden (Abb. 23). Da die E4orf6-NES-Proteine, vermutlich aufgrund der geringeren E4orf6-Gleichgewichtsmengen, schwächer an pp32 binden, könnte dies eine mögliche Erklärung für die leichten Defekte während des Exports später viraler Transkripte sein. Zusätzlich konnte erstmals die Bindung von E1B-55K an APRIL gezeigt werden. Es wäre also möglich, dass E1B-55K bzw. E4orf6 über die Interaktion mit APRIL bzw. pp32 und HuR den Export viraler mRNAs ermöglichen.

---

Es gibt jedoch mehrere Aspekte, die gegen dieses Modell sprechen. Zum einen wurde die nukleäre Akkumulation der hsp70-mRNA nach Blockierung des CRM1-abhängigen Exports mit LMB von Gallouzi und Mitarbeitern widerrufen (Gallouzi *et al.*, 2003). Zum anderen beinhalten späte adenovirale mRNAs, deren Export vom E1B-55K/E4orf6-Komplex abhängig ist, weder AREs noch sonstige gemeinsamen Sequenzmotive, die für den selektiven Export verantwortlich sind. Obwohl der *tripartite leader* (TPL) die Effizienz des Kernexports steigert (Huang und Flint, 1998), ist dieser 5'-Bereich in allen späten Transkripten der MLTU (*major late transcription unit*) für den RNA-Transport nicht essenziell (Dix und Leppard, 1993; Leppard, 1993). Zudem können nicht nur Hitzeschock-mRNAs dem adenoviralen Exportblock in der späten Phase entkommen, sondern auch andere, aktiv transkribierte zelluläre Transkripte, die ebenfalls keine AREs besitzen, wie z. B. die 6-16, Mx-A oder  $\beta$ -Tubulin mRNA. Zusammengefasst zeigt dies, dass vermutlich nicht Struktur- oder Sequenz-Merkmale für den selektiven RNA-Export wichtig sind, sondern dass die Aktivierung der Transkription während der späten Phase der Infektion mit der Exporteffizienz korreliert (Yang *et al.*, 1996). Da in der späten Phase der Adenovirus-Infektion überwiegend virale Transkripte entstehen, wäre es möglich, dass diese aktiv transkribierten Einheiten und deren RNA-Produkte an spezialisierten nukleären Substrukturen lokalisieren, die den Export von mRNAs erleichtern. Ein ähnliches, als „*gene gating*“ bezeichnetes Modell wurde bereits 1985 von Blobel für zelluläre Transkripte vorgeschlagen (Blobel, 1985).

Konsistent mit diesem Modell ist die Beobachtung, dass es in Adenovirus-infizierten Zellkernen zu erheblichen Veränderungen bestehender Strukturen und zur Bildung neuer Strukturen, den viralen Einschlusskörperchen kommt. Diese enthalten hohe Konzentrationen des viralen Einzelstrang DNA-bindenden Proteins (DBP) der frühen Transkriptionseinheit 2A (Sugawara *et al.*, 1977; Reich *et al.*, 1983; Voelkerding und Klessig, 1986). In der Peripherie dieser Strukturen, die als periphere replikative Zone bezeichnet wird, befinden sich sowohl virale Genome als auch virale RNA (Puvion-Dutilleul und Puvion, 1990b; Puvion-Dutilleul und Puvion, 1990a; Puvion-Dutilleul und Pichard, 1992; Puvion-Dutilleul *et al.*, 1992; Pombo *et al.*, 1994; zur Übersicht:

---

Bridge und Pettersson, 1996). Gleichzeitig mit der Aktivierung der späten viralen Genexpression werden viele zelluläre snRNPs (*small nuclear ribonucleoprotein*) und Spleißproteine zu der peripheren replikativen Zone relokalisiert (Bridge *et al.*, 1993a; Puvion-Dutilleul *et al.*, 1994; Bridge *et al.*, 1995; Bridge *et al.*, 1996; Rebelo *et al.*, 1996; Aspegren *et al.*, 1998; Aspegren und Bridge, 2002; Gama-Carvalho *et al.*, 2003). Mit fortschreitender Infektion entwickeln sich große virale Einschlusskörper, die vermutlich als Virusgenomlagerstätten fungieren (Bridge und Pettersson, 1996). Zusätzlich kommt es zu einer erneuten Umverteilung der snRNPs und Spleißfaktoren in sogenannte vergrößerte Interchromatinkörperchen (IGs, *enlarged interchromatin granules*). Dort findet keine Transkription statt, sondern sie enthalten eine große Menge an polyadenylierter und gespleißter viraler RNA, was auf eine Rolle dieser Subdomänen in der posttranskriptionellen Prozessierung bzw. im Export der RNA hindeutet (Bridge und Pettersson, 1996; Aspegren *et al.*, 1998; Aspegren und Bridge, 2002).

Interessanterweise lokalisiert auch das E1B-55K-Protein zum Teil an der Peripherie der viralen Replikations- und Transkriptionszentren (Ornelles und Shenk, 1991; Doucas *et al.*, 1996). Mit Hilfe von Fraktionierungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass in E1B-55K-deletierten Virusmutanten die späten viralen Transkripte nicht in der löslichen nukleären Kernfraktion (F3) akkumulierten. Es wurde deshalb angenommen, dass E1B die Freisetzung der RNA vom Ort der Transkription, der nukleären Matrix (F5), erleichtert (Jackson *et al.*, 1981; Leppard und Shenk, 1989). Der direkte Transport von mRNA durch E1B-55K scheint dabei jedoch eher unwahrscheinlich, da die RNA-bindenden Eigenschaften von E1B nur sehr unspezifisch und schwach sind (Horridge und Leppard, 1998). Deshalb ist vermutlich für die Interaktion von E1B-55K mit viraler mRNA ein weiteres Adapterprotein nötig, das ebenfalls in den viralen Replikations- und Transkriptionszentren lokalisiert. Diese Annahme würde dem von Ornelles und Shenk vorgeschlagenen Modell entsprechen, bei dem der E1B-55K/E4orf6-Komplex einen limitierenden zellulären Faktor, der für die zytoplasmatische Akkumulation von mRNA wichtig ist, in die peripheren replikativen Zonen rekrutiert (Ornelles und Shenk, 1991). Die Identität dieses Faktors

konnte jedoch bis jetzt noch nicht geklärt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals die Interaktion von E1B-55K mit Aly/REF1 nachgewiesen werden (Abb. 24). Aly/REF1 gehört zur Familie der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine (hnRNP) und ist Bestandteil des Exon-Junction-Komplex (EJC; Le Hir *et al.*, 2000). Aly/REF1 ist neben einer Vielzahl weiterer Faktoren am Export der meisten zellulären mRNAs beteiligt (zur Übersicht: Erkmann und Kutay, 2004). Dabei bilden Adapterproteine, unter anderem auch Aly/REF1 die Verbindung der mRNA mit dem eigentlichen Exportrezeptor TAP/NXF1 (Stutz *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2001; Gatfield und Izaurralde, 2002). TAP/NXF1 kann dann als Heterodimer zusammen mit p15/NXT1 (*NTF2-related export protein1*), über die Interaktion mit Kernporenproteinen die Translokation der mRNAs durch die Kernpore ins Zytoplasma vermitteln (Segref *et al.*, 1997; Gruter *et al.*, 1998; Santos-Rosa *et al.*, 1998; Katahira *et al.*, 1999; Herold *et al.*, 2000; Braun *et al.*, 2001; Fribourg *et al.*, 2001; Izaurralde, 2002; Wiegand *et al.*, 2002).

Die adenovirale Transkription ist abhängig von der Aktivität der zellulären RNA-Polymerase II. Virale Transkripte werden von der zellulären posttranskriptionellen Prozessierungsmaschinerie am 5'-Ende gekappt, zum Teil gespleißt und polyadenyliert und ähneln daher den zellulären mRNAs (zur Übersicht: Shenk, 2001). Es wäre deshalb möglich, dass Adenoviren den gleichen Exportweg wie zelluläre mRNAs verwenden und durch die Rekrutierung eines limitierenden zellulären Faktors für den mRNA-Export die zellulären Transkripte im Zellkern zurückhalten. Neueste Analysen zeigen, dass das Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV1) Protein ICP27 virale mRNA mit Hilfe von TAP/NXF1 vom Kern ins Zytoplasma transportiert. Dabei bindet ICP27 sowohl an TAP/NXF1 als auch an Aly/REF1 (Koffa *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005).

Die Untersuchung der subzellulären Verteilung von Aly/REF1 in Adenovirus-infizierten Zellen zeigte, dass die Lokalisation von Aly/REF1 den bereits beschriebenen Verteilungsmustern von Spleißfaktoren in infizierten Zellen gleicht (Bridge *et al.*, 1993a; Bridge *et al.*, 1995; Bridge *et al.*, 1996; Aspegren *et al.*, 1998; Aspegren und Bridge, 2002; Gama-Carvalho *et al.*, 2003). In der späten Phase der Infektion ist

Aly/REF1 in allen untersuchten Virusmutanten in mehreren nukleären Strukturen konzentriert (Abb. 25 e, n, q und t), die vermutlich mit den IGs identisch sind und an der Peripherie der viralen Replikations- und Transkriptionszentren akkumulieren. Da die Lokalisation von viraler mRNA in den IGs eine Voraussetzung für den effizienten Export ist (Bridge und Pettersson, 1996; Aspegren *et al.*, 1998; Aspegren und Bridge, 2002), gibt dies einen Hinweis darauf, dass Aly/REF1 am Export adenoviraler RNA beteiligt sein könnte. Es wäre möglich, dass der E1B-55K/E4orf6-Komplex die Transition der viralen mRNA vom Ort der Transkription zu den IGs erleichtert bzw. die Freisetzung aus den IGs vermittelt. Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass E1B-55K die Akkumulation viraler mRNAs in der löslichen Kernfraktion fördert (Leppard und Shenk, 1989). Da Aly/REF1 nur an aktiv transkribierte RNAs bindet, wäre dies auch eine mögliche Erklärung dafür, dass der RNA-Transport mit der Aktivierung der Transkription in Verbindung steht. Zudem wird Aly/REF1 und in Folge dessen vermutlich auch TAP/NXF1 zu den viralen Transkriptionszentren rekrutiert und steht somit nicht mehr für den Export zellulärer Transkripte zur Verfügung, was zum Abschalten des zellulären mRNA-Exports führen könnte.

Insgesamt führen die Daten dieser Arbeit zu der Modellvorstellung, dass E1B-55K mit Hilfe von Adapterproteinen, wie z. B. Aly/REF1 an virale mRNA bindet. Da jedoch die Bindung durch die NES-Mutationen in E1B-55K und E4orf6 stark reduziert ist (Abb. 24), dies jedoch nur zu einem relativ geringen Exportdefekt der Mutante H5pm4119 führt (Abb. 22), gibt es vermutlich weitere Adapterproteine, die die Verbindung zwischen viraler mRNA und E1B-55K herstellen können. Die Bindung von E1B-55K an Aly/REF1 und somit indirekt an den Exportrezeptor TAP/NXF1 ist neben der Untersuchung der verschiedenen NES-Virusmutanten, ein weiterer Hinweis darauf, dass späte adenovirale mRNAs nicht CRM1-abhängig ins Zytoplasma transportiert werden. Weitere Arbeiten in diese Richtung werden sicherlich zu einem besseren Verständnis des selektiven mRNA-Exports in Adenovirus-infizierten Zellen beitragen.

### 6.3 Mutationen im NES von E4orf6 führen zu einem verminderten Abbau von p53 und Mre11

E4orf6 ist in Kombination mit E1B-55K dazu in der Lage, die Halbwertszeit einiger zellulärer Proteine, wie z. B. p53 und Mre11 herabzusetzen, indem es diese Proteine in den Ubiquitin-abhängigen, proteolytischen Abbauweg einschleust (Grand *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 1996; Querido *et al.*, 1997; Ridgway *et al.*, 1997; Roth *et al.*, 1998; Steegenga *et al.*, 1998; Nevels *et al.*, 1999a; Cathomen und Weitzman, 2000; Querido *et al.*, 2001b; Stracker *et al.*, 2002). Dabei stellt E4orf6 die Verbindung zu zellulären Proteinen dar um eine SCF-ähnliche E3-Ubiquitin-Ligase zu bilden. E1B-55K fungiert vermutlich als Substratlieferant, der die zu ubiquitinylierenden Proteine, wie p53 und Mre11 bindet und der E3-Ligase zuführt (Querido *et al.*, 2001a; Harada *et al.*, 2002; Blanchette *et al.*, 2004). Unklar ist jedoch noch, ob der Abbau von p53 und Mre11 an nukleären oder zytoplasmatischen Proteasomen stattfindet (Harada *et al.*, 2002). Neueste Untersuchungen zeigen, dass der Abbau von Mre11 vermutlich mit dessen Export in zytoplasmatische Aggresome in Zusammenhang steht (Araujo *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005). Dabei spielt wahrscheinlich auch das adenovirale E4orf3-Protein eine wichtige Rolle (Araujo *et al.*, 2005), das zudem die Umverteilung von Mre11 in nukleäre Strukturen bewirken kann (Stracker *et al.*, 2002; Evans und Hearing, 2003; Evans und Hearing, 2005; Stracker *et al.*, 2005). Außerdem zeigen die Daten von Liu und Mitarbeitern, dass die Zugabe von LMB, einem Inhibitor des CRM1-vermittelten Exports, zu einem verringerten Mre11-Abbau führt (Liu *et al.*, 2005). Da jedoch nach LMB-Behandlung alle CRM1-abhängigen Exportwege blockiert werden, kann der von Liu beschriebene Defekt nicht zweifelsfrei auf E1B-55K bzw. E4orf6 zurückgeführt werden.

Daher sollten Untersuchungen an Virusmutanten, bei denen die NESs von E1B-55K und E4orf6 inaktiviert wurden, genauere Erkenntnisse über die Rolle der CRM1-abhängigen Exportfunktion der viralen Proteine beim Abbau von Mre11 und p53 liefern. Interessanterweise konnten jedoch keine signifikanten Defekte beim Mre11-Abbau in der E1B-NES-Virusmutante H5pm4101 als auch in der SKM-Mutante H5pm4102 festgestellt werden. Dies weist darauf hin, dass der Export von E1B-55K



---

nicht essenziell für den beschleunigten Abbau von Mre11 ist (Abb. 15). In Zellen, die mit der Mutante H5pm4101 infiziert wurden, konnten nur sehr wenige, in H5pm4102-infizierten Zellen jedoch mehrere zytoplasmatische Aggregate zusammen mit Mre11 im Vergleich zum Wildtypvirus detektiert werden. Da beide Virusmutanten aber einen leicht verzögerten Abbau von Mre11 aufwiesen, zeigen die Daten außerdem, dass der Export von Mre11 zusammen mit E1B zu den zytoplasmatischen Aggregaten vermutlich nicht mit der Fähigkeit der verschiedenen Virusmutanten korreliert, Mre11 abzubauen. Konsistent mit den Beobachtungen von Liu nach LMB-Behandlung (Liu *et al.*, 2005), führen Mutationen im E4orf6-NES zu einem verminderten Abbau von Mre11 (Abb. 27). Dies deutet darauf hin, dass ein intaktes NES im E4orf6-Protein wichtig für dessen Funktion bei der Degradation verschiedener Substrate ist. Auch der Abbau von p53 ist durch die Mutation des E4orf6-NES stark beeinträchtigt (Abb. 27). Ein leichter Defekt im p53-Abbau konnte auch schon in Transfektionsexperimenten (Querido *et al.*, 2001b) sowie in Untersuchungen an stabil transformierten BRK-Zellen festgestellt werden (Nevels *et al.*, 2000). Es wäre jedoch auch denkbar, dass die Mutation des NES weitere bisher unbekannte Funktionen von E4orf6 beeinträchtigt und es deshalb zu den beobachteten Defekten kommt. Zusätzlich vermindert die NES-Mutation die Gleichgewichtsmenge von E4orf6-NES (Abb. 17 B) und die Wechselwirkung mit E1B-55K drastisch (Abb. 27 B). Ob die Verringerung des Abbaus von Mre11 und p53 direkt auf die Mutation des E4orf6-NES zurückgeführt werden kann, oder ob es sich dabei um sekundäre Nebeneffekte handelt, muss in weiterführenden Experimenten geklärt werden.

Interessanterweise war auch die E1B-NES-Virusmutante trotz normaler E1B- und E4orf6-Proteinmengen, nicht dazu in der Lage p53 vollständig abzubauen (Abb. 15). Dies deutet darauf hin, dass die Degradation von p53 zumindest teilweise vom Vorhandensein eines funktionellen NES von E1B abhängig ist. In Übereinstimmung dazu erfolgt die Destabilisierung von p53 durch das virale E6-Protein der Hochrisiko-Papillomviren (HPV16 und HPV18) zumindest teilweise durch den nukleären Export des viralen Polypeptids (Freedman und Levine, 1998). Ebenso kann das Onkoprotein hdm2, ein zellulärer Antagonist des p53-Proteins, mit Hilfe eines intrinsischen NES

zwischen Zellkern und Zytoplasma pendeln. Zudem ist das hdm2-Protein für den Ubiquitin-/Proteasomen-abhängigen Abbau von p53 verantwortlich. Mutationen im NES des hdm2-Proteins führen ebenfalls zu einer verminderten Degradation von p53 im Vergleich zum Wildtyp-hdm2 (Roth *et al.*, 1998; Tao und Levine, 1999; Ryan *et al.*, 2001).

Insgesamt weisen diese Resultate auf eine Beteiligung des NES von E1B-55K beim Abbau von p53, nicht aber Mre11 hin.

### **6.3.1 Defekte im p53- und Mre11-Abbau führen zu einer verminderten adenoviralen Replikation**

Es wird angenommen, dass der Abbau von p53 und Mre11 für den viralen Replikationszyklus entscheidend ist. In Folge der Virusinfektion kommt es zu einer Stabilisierung des Tumorsuppressors p53, was normalerweise zu Zellzyklusarrest und Apoptose führen würde (Rao *et al.*, 1992; Debbas und White, 1993; Lowe und Ruley, 1993; Vousden, 1995; Bates und Vousden, 1996; White, 1998; Vogelstein *et al.*, 2000; Vousden, 2000; Vousden und Lu, 2002). Mre11 ist Bestandteil eines zellulären Komplexes, der für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, für die meiotische Rekombination und die Erhaltung der Telomere wichtig ist (Carney *et al.*, 1998; Haber, 1998; Petrini, 1999; Zhu *et al.*, 2000; D'Amours und Jackson, 2002). Nicht inhibiert würde die Funktion dieses Komplexes im Verlauf der Adenovirusinfektion zur Konkatemerisierung der linearen doppelsträngigen Virus-DNA führen, was negative Folgen für die virale Replikation hat (Stracker *et al.*, 2002; Evans und Hearing, 2005). Um diesen negativen Einflüssen zu entgehen, haben viele Viren Mechanismen entwickelt, um p53 und Mre11 zu inhibieren (Levine, 1997).

Obwohl viel darüber bekannt ist, dass Adenoviren sowie viele andere DNA-Tumoviren dem Tumorsuppressorprotein p53 entgegenwirken (Shenk, 2001), konnte bisher nicht geklärt werden, ob die Inaktivierung von p53 wichtig für die virale Replikation ist. Es wird angenommen, dass der durch p53 vermittelte Zellzyklusarrest und die Apoptose die effiziente virale Replikation verhindert (Bischoff *et al.*, 1996; Kirn und

McCormick, 1996). Dennoch fehlt bis jetzt der direkte Beweis dieser Hypothese. Erste Erkenntnisse dazu lieferten Untersuchungen an der Virusmutante ONYX-053, deren Fähigkeit p53 zu binden durch einen AS-Austausch an Position 260 (H260A) zerstört wurde. Diese Mutante war nicht mehr in der Lage p53 abzubauen, zeigte aber nur geringe Unterschiede bei der Synthese später Proteine und Nachkommenviren im Vergleich zum Wildtypvirus (Shen *et al.*, 2001). Überraschenderweise war die hier untersuchte Virusmutante H5pm4109, die den gleichen AS-Austausch trägt, sowohl bei der Synthese später Strukturproteine (Abb. 32) als auch bei der Produktion von Nachkommenviren stark eingeschränkt (Abb. 33). Dieser Unterschied könnte zum einen darauf zurückgeführt werden, dass es sich bei ONYX-053 um ein Ad2/Ad5-chimäres Virus handelt, wohingegen H5pm4109 mit Ad5 isogen ist. Zum anderen wurde die Produktion von Nachkommenviren von Shen und Mitarbeitern in der p53-negativen Zelllinie H1299 untersucht (Shen *et al.*, 2001). Somit lässt dies keine Rückschlüsse auf die Rolle von p53 während der viralen Replikation zu. Aufgrund der eingeschränkten späten Funktionen der Virusmutante H5pm4109 wäre es deshalb denkbar, dass die erhöhten p53-Mengen die virale Replikation beeinträchtigen. Da die Mutante H5pm4109 jedoch auch Mre11 nicht mehr dem proteolytischen Abbauweg zuführen kann (Abb. 30), könnten die Defekte auch durch die erhöhte Mre11-Menge verursacht werden. Wie bereits erwähnt bildet Mre11 zusammen mit NBS1 und Rad50 einen zellulären trimeren Komplex, der u. a. die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen veranlasst. Die Aktivität dieses Komplexes führt in Adenovirus-infizierten Zellen zur Konkatemisierung der linearen doppelsträngigen Virus-DNA. Um dies zu verhindern wird Mre11 vom E1B-55K/E4orf6-Komplex proteolytisch abgebaut und zusätzlich von einem weiteren viralen Protein, E4orf3 aus den viralen Replikationszentren in fibrilläre nukleäre Strukturen umlokalisiert (Stracker *et al.*, 2002; Evans und Hearing, 2003). Das E1B-Protein der Virusmutante H5pm4127 ist nicht mehr in der Lage Mre11 zu binden und abzubauen (Abb. 30). Desweiteren konnte diese Mutante, ebenso wie H5pm4109 auch p53 nicht mehr dem proteasomalen Abbauweg zuführen und wies ähnliche Defekte bei der Produktion später viraler Proteine und Nachkommenviren auf (Abb. 32 und 33).

---

Da sowohl die H260A- als auch die C454S/C456S-Mutationen den Abbau von p53 und Mre11 verhindern, kann nicht zweifelsfrei geklärt werden, ob sich die Defekte der Mutanten H5pm4109 und H5pm4127 auf die erhöhten p53- oder Mre11-Mengen beziehen. Neue Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Anwesenheit von p53 das virale Wachstum nicht inhibiert (Goodrum und Ornelles, 1998; Harada und Berk, 1999; Koch *et al.*, 2001), sondern sogar die virale Genexpression verstärkt und somit die adenovirale Replikation fördert (Royds *et al.*, 2006). Zudem konnte gezeigt werden, dass zwar im Verlauf der Virusinfektion große Mengen an p53 akkumulieren, dieses jedoch nicht in der Lage ist die Transkription weiterer Gene zu aktivieren und somit Zellzyklusarrest und Apoptose einzuleiten (Hobom und Dobbstein, 2004; O'Shea *et al.*, 2004). Dies deutet darauf hin, dass das Virus mehrere Strategien entwickelt hat um den antiproliferativen Aktivitäten von p53 entgegenzuwirken. Dabei ist denkbar, dass die Degradation von p53 vermutlich nicht der einzige Weg ist, um die virale Replikation zu fördern. Ferner existiert ein weiteres Ad2/Ad5-chimäres Virus, die Mutante H354, die eine 4 AS lange Insertion an Position 354 trägt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Mutante Mre11 nicht mehr abbauen kann, was ebenfalls mit einer verminderten Produktion später viraler Strukturproteine und Nachkommenviren korreliert (Yew *et al.*, 1990; Gonzalez und Flint, 2002). Deshalb ist wahrscheinlich die erhöhte Mre11-Gleichgewichtsmenge der schwerwiegendere Faktor für den Defekt der untersuchten Virusmutanten H5pm4109, H5pm4127 und H5pm4143.

Diese Virusmutanten exprimieren normale Mengen an E4orf3, welches die Relokalisation von Mre11 veranlassen kann (Daten nicht gezeigt). Zudem wird vermutet, dass diese Relokalisation eine wichtige Voraussetzung für eine effiziente virale DNA-Replikation ist (Evans und Hearing, 2005). Dies ist konsistent mit den Beobachtungen, dass die Mutationen im E1B-55K-Protein keinen gravierenden Einfluss auf die Initiation und die Effizienz der viralen DNA-Synthese haben (Abb. 31). Dennoch ist die Umlokalisierung von Mre11 aus den viralen Replikationszentren vermutlich nicht ausreichend um die Bildung viraler Genomkonkatemere zu verhindern (Evans und Hearing, 2003). Desweiteren wird kontrovers diskutiert, ob die

Konkatemerbildung einen Einfluss auf die virale Strukturproteinsynthese bzw. die Produktion von Nachkommenviren hat (Evans und Hearing, 2003; Shepard und Ornelles, 2004; Jayaram und Bridge, 2005). Jayaram und Bridge konnten zeigen, dass die Vermeidung der Konkatemerbildung die Akkumulation später viraler mRNAs stimuliert (Jayaram und Bridge, 2005). Interessanterweise waren die relativen L5-mRNA Mengen auch in den Virusmutanten H5pm4109, H5pm4127 und H5pm4143 im Vergleich zum Wildtypvirus stark verringert (Abb. 34). Dies deutet darauf hin, dass diese Transkripte entweder weniger stark transkribiert werden oder dass die Stabilität dieser mRNAs verringert ist. Es könnte sein, dass die viralen Genomkonkatemere die normalerweise streng organisierten Prozesse der Transkription und Prozessierung von mRNAs stören und dies so zu einer geringeren Stabilität viraler mRNA führt. Zum Nachweis dieser Hypothese muss untersucht werden, ob es in den Virusmutanten H5pm4109, H5pm4127 und H5pm4143 tatsächlich zur Bildung von viralen Genomkonkatemeren kommt.

Untersuchungen am viralen IVa2-Protein könnten eine weitere sehr spekulative Erklärung für die verringerten viralen mRNA-Mengen liefern. Das IVa2-Protein ist essenziell für die virale Replikation, da es eine bedeutende Rolle während der Verpackung der viralen DNA ins Viruskapsid spielt (Zhang und Imperiale, 2000; Zhang *et al.*, 2001; Zhang und Imperiale, 2003). Außerdem dient es als wichtiger Transkriptionsaktivator des MLP (Tribouley *et al.*, 1994; Lutz und Kedinger, 1996; Pardo-Mateos und Young, 2004b; Pardo-Mateos und Young, 2004a). Kürzlich konnte das IVa2-Protein als neuer Interaktionspartner von E1B-55K identifiziert werden (Harada *et al.*, 2002). Da in der späten Phase der Infektion die Transkriptionsrate von Transkripten der MLTU in E1B-deletierten Viren im Vergleich zum Wildtypvirus reduziert ist (Pilder *et al.*, 1986b; Williams *et al.*, 1986; Leppard, 1993), wäre es möglich, dass E1B-55K über die Interaktion mit IVa2 direkt die Transkription der MLTU beeinflusst. Ob jedoch die H260A- und die C454S/C456S-Mutationen die Bindung an IVa2 beeinträchtigen und dies der Grund für den verringerten L5-mRNA-Level ist, muss in weiterführenden Experimenten geklärt werden.

Der MRN-Komplex ist nicht nur aktiv an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt, sondern dient auch als Sensor für DNA-Schäden und führt zur Aktivierung der PI3-ähnlichen Kinasen ATM (*ataxia-telangiectasia-mutated*) und ATR (*ATM-Rad3-related*; Carson *et al.*, 2003; Lee und Paull, 2004; Lee und Paull, 2005; Paull und Lee, 2005). Die Aktivierung dieser Kinasen führt dann zur Phosphorylierung von Proteinen, die Zellzyklusarrest, Apoptose und DNA-Reparatur veranlassen (zur Übersicht: Kastan und Lim, 2000; Shiloh, 2003). Das E1B-55K-Protein kann bekanntermaßen Einschränkungen der viralen Replikation, die durch die Phase des Zellzyklus bedingt sind, aufheben. Das heißt, dass v. a. Zellen in der S-Phase das Wachstum von E1B-deletierten Viren unterstützen können (Goodrum und Ornelles, 1997; Goodrum und Ornelles, 1999). Zunächst wurde angenommen, dass das Tumorsuppressorprotein p53 für die selektive Replikation E1B-deletierter Viren verantwortlich ist. Es gibt jedoch eine Reihe von Veröffentlichungen die diese Hypothese bezweifeln (Goodrum und Ornelles, 1997; Goodrum und Ornelles, 1998; Rothmann *et al.*, 1998; Harada und Berk, 1999; Turnell *et al.*, 1999). Da der MRN-Komplex ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzykluses spielt, wäre es möglich, dass die Aktivität dieses Komplexes die Zellzyklusabhängigkeit von E1B-55K-deletierten Viren verursacht. Deshalb ist die Inhibition dieses Komplexes vermutlich ein entscheidender Schritt für die effiziente Replikation von Adenoviren. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass das adenovirale Protein E4orf3, das ebenfalls zur Inaktivierung des MRN-Komplexes beiträgt, für den produktiven Replikationszyklus E1B-deletierter Viren in der S-Phase wichtig ist (Shepard und Ornelles, 2003). Zudem konnte gezeigt werden, dass aktive Proteasomen für die virale Replikation essenziell sind. Mit Hilfe von Komplementationsanalysen in einer p53-negativen Zelllinie wurde deutlich, dass p53 nicht das für die Virusreplikation ausschlaggebende Zielprotein des E1B-55K/E4orf6-Komplexes ist (Corbin-Lickfett und Bridge, 2003). Aufgrund dieser Daten kann man spekulieren dass der Abbau des MRN-Komplexes bzw. weiterer bisher unbekannter zellulärer Proteine eine wichtige Voraussetzung für den adenoviralen Replikationszyklus darstellt.

---

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die Mutationen in den Virusmutanten H5pm4109, H5pm4127 und H5pm4143, die die Degradation von Mre11 und p53 verhindern, zu einer verminderten Akkumulation später viraler mRNA (Abb. 34), sowie zu einer verringerten Produktion später viraler Proteine (Abb. 32) und Nachkommenviren (Abb. 33) führt. Auch die Virusmutanten H5pm4116 und H5pm4119, die Mutationen im NES des E4orf6-Proteins tragen, können Mre11 und p53 nicht mehr effizient abbauen (Abb. 27). Dies ist jedoch nur mit verhältnismäßig geringen Defekten gekoppelt (Abb. 20 - 22). Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass in den Virusmutanten H5pm4109, H5pm4127 und H5pm4143 eine weitere bisher unbekannte Funktion von E1B-55K beeinträchtigt wird, die die schweren Defekte dieser Virusmutanten verursacht. Eine Möglichkeit könnte die vorher erwähnte Modulation des viralen Proteins IVa2 sein.

#### **6.4 Die 48K/49K-Isoformen des E1B-Proteins sind ausreichend um die virale Replikation zu unterstützen**

Die E1B-Region von Ad5 kodiert für mindestens fünf verschiedene Polypeptide, die durch alternatives Spleißen aus einer Vorläufer-mRNA gebildet werden (Anderson *et al.*, 1984; Virtanen und Pettersson, 1985; Lewis und Anderson, 1987). Mit Hilfe der Virusmutante H5pm4133, die zwei Stoppkodons an den AS-Positionen drei und acht trägt, sowie des E1B-spezifischen, C-terminalen Antikörpers 7C11, konnten im Rahmen dieser Arbeit zwei weitere N-terminal deletierte Isoformen von E1B-55K - E1B-48K und E1B-49K - identifiziert werden (Abb. 39). Bereits 1987 wurde eine verkürzte Form von E1B-55K beobachtet, jedoch konnte die Herkunft und Identität dieses Proteins nicht eindeutig geklärt werden (Barker und Berk, 1987). Obwohl nur sehr geringe Mengen dieser verkürzten E1B-Isoformen im Verlauf der Virusinfektion hergestellt werden (Abb. 39), reichen sie aus, um alle bisher bekannten Funktionen von E1B-55K während der viralen Replikation zu erfüllen (Abb. 37 und 38). Zudem konnte gezeigt werden, dass E1B-55K anscheinend einen positiven Einfluss auf die Stabilität von E4orf6 hat. Sobald nur geringe Mengen von E1B exprimiert werden, wie

in der Virusmutante H5pm4133 (Abb. 38), oder E1B-55K vollständig fehlt, wie in dl1520 (Abb. 15 A und 17 B), ist auch die Gleichgewichtsmenge von E4orf6 reduziert. Ähnliches kann man beobachten, wenn man die Funktion von E1B-55K als Substratlieferant der E3-Ligase einschränkt, wie in den Virusmutanten H5pm4109 und H5pm4127 (Abb. 30). Dennoch reichen die reduzierten Mengen von E4orf6 und E1B in der Mutante H5pm4133 aus, um alle Funktionen des E1B/E4orf6-Komplexes während des viralen Replikationszyklus zu erfüllen (Abb. 37 und 38).

Weitere Erkenntnisse über die beiden verkürzten Isoformen konnten mit Hilfe von E1B-Expressionsplasmiden, die die beiden Stoppkodons an AS-Position drei und acht und zusätzlich Mutationen in den alternativ verwendeten ATG-Startkodons an AS-Positionen 64 und 75 enthielten, erlangt werden (Abb. 40 A). Die Gleichgewichtsmenge der kürzeren 48K-Isoform (pE1B-1670) war nach Transfektion geringer als die der 49K-Isoform (pE1B-1671; Abb. 40 B). Dies deutet darauf hin, dass das E1B-49K-Protein entweder stabiler ist oder dass mehr von diesem Protein translatiert wird.

Interessanterweise konnte bei der 49K-Form eine Doppelbande detektiert werden, wohingegen die 48K-Isoform nur als Einzelbande vorlag. Bei der Doppelbande könnte es sich um eine posttranslationale Modifikation, wie z. B. Phosphorylierung handeln. Es ist bereits bekannt, dass das E1B-55K-Protein an drei C-terminalen AS phosphoryliert wird und diese Phosphorylierung wichtig für die Repression der p53-vermittelten Transkriptionsaktivierung ist (Teodoro *et al.*, 1994; Teodoro und Branton, 1997). Zudem war in den Luziferaseversuchen nur die längere 49K-Isoform in der Lage, die p53-abhängige Transkription zu inhibieren (Abb. 40 C). Es wäre daher möglich, dass zwischen den AS 64 und 75 eine, für die Repression der p53-stimulierten Transkription wichtige Funktion des E1B-Proteins kodiert. Da bekanntermaßen die Phosphorylierung wichtig ist, kann man spekulieren, dass dieser AS-Bereich die Phosphorylierung von E1B fördert. Eine andere Möglichkeit für die reduzierte Repressionsfähigkeit von E1B-48K könnte die geringe Gleichgewichtsmenge dieser Isoform darstellen. Wie bereits erwähnt, wäre es denkbar, dass von dieser kürzeren Form weniger translatiert wird.

Die viralen mRNAs haben wie zelluläre ein 5'-Cap und sind polyadenyliert und



---

werden deshalb normalerweise *Cap*-abhängig translatiert. Eine Ausnahme bilden die späten viralen mRNAs, deren Translationsinitiation mit Hilfe des L4-100K-Proteins *Cap*-unabhängig erfolgt (Cuesta *et al.*, 2000; Yueh und Schneider, 2000; Cuesta *et al.*, 2004; Xi *et al.*, 2004; Xi *et al.*, 2005). Bei der *Cap*-abhängigen Translation bindet der Translationsinitiationskomplex an das 5'-*Cap* der mRNA und wandert dann an der mRNA entlang bis zum ersten möglichen Startkodon. Das konservierte Sequenzmotiv für die Erkennung des Startkodons wird als Kozak-Sequenz bezeichnet und ist GCCRCCAugG. Dabei ist das Purin (R; A oder G) an Position -3 und das G an Position +4 hochkonserviert und am wichtigsten für die Translationsinitiation (zur Übersicht: Kozak, 2002). Das bedeutet, dass die Translation normalerweise hauptsächlich am erste Startkodon vom 5'-Ende der mRNA initiiert wird und somit im Falle von E1B die verkürzten Formen nicht translatiert werden könnten. Es gibt jedoch verschiedene Mechanismen um die Translation von stromabwärts liegenden Startkodons zu ermöglichen. Bei der ersten handelt es sich um das sogenannte *leaky scanning*. Das bedeutet, dass falls die Kozak-Sequenz des ersten Startkodons nicht optimal ist, der ribosomale Präinitiationskomplex dieses nicht als Startkodon erkennt und deshalb weiter auf der mRNA zum nächsten möglichen Startkodon entlang wandert. Dies ist vermutlich auch der Mechanismus, der zur Bildung von E1B-19K (GACCUCaugG) und E1B-55K (GGAUAAaugG) führt (Bos *et al.*, 1981). Weil auch die Kozak-Sequenz beim AUG von E1B-55K nur suboptimal ist, könnte es sein, dass der Präinitiationskomplex das Startkodon erneut nicht erkennt und die mRNA nach weiteren Starts absucht. Da die Wahrscheinlichkeit für die Translationsinitiation an stromabwärts gelegenen AUGs immer geringer wird, könnte dies auch die verringerte Gleichgewichtsmenge der verkürzten Isoformen erklären.

Durch die Einführung der beiden Stoppkodons in den E1B-55K-Leserahmen der verschiedenen Expressionsplasmide bzw. der Virusmutante H5pm4133 kommt es eigentlich zum Abfallen der Ribosomen von der mRNA. Es kann jedoch zum Vorgang der Reinitiation kommen. Dabei wird bei Erreichen eines Stoppkodons nur die 60S ribosomale Untereinheit freigesetzt, während die 40S Untereinheit an der mRNA gebunden bleibt und somit an einem weiter stromabwärts gelegenen Start die

Translation neu initiieren kann (zur Übersicht: Kozak, 2002).

Eine letzte Möglichkeit zur Initiation der Translation wäre das Vorhandensein einer internen Ribosomen Eintrittsstelle (IRES, *internal ribosome entry site*) an der mRNA. Dabei kann die Translationsmaschinerie direkt am bzw. in der Nähe des Startkodons assemblieren, ohne die gesamte 5'-UTR (untranslatierte Region) nach möglichen AUGs abzusuchen. Da trotz vielfältiger Vergleiche verschiedener IRES mit Ausnahme eines Polypyrimidin-Stücks noch keine Konsensus-Sequenz ermittelt werden konnte, geht man davon aus, dass die Sekundärstruktur der mRNA ein wesentlicher Bestandteil der Effizienz einer IRES ist (zur Übersicht: Hellen und Sarnow, 2001). Um zu überprüfen, ob es sich bei der Translation der verkürzten E1B-Isoformen um eine IRES handelt, müssen weiterführende Experimente durchgeführt werden.

Zusammenfassend zeigen die Daten des letzten Teils dieser Arbeit, dass neben den bisher bekannten E1B-Proteinen zwei weitere N-terminal verkürzte Isoformen gebildet werden, die trotz der geringen Gleichgewichtsmengen für die effiziente virale Replikation ausreichen.

## 7 Literaturverzeichnis

---

---

- Abramoff, M. D., P. J. Magalhaes und S. J. Ram.** (2004). Image Processing with ImageJ, S. 36-42, Biophotonics International, vol. 7.
- Adachi, Y. und M. Yanagida.** (1989). Higher order chromosome structure is affected by cold-sensitive mutations in a *Schizosaccharomyces pombe* gene *crm1+* which encodes a 115-kD protein preferentially localized in the nucleus and its periphery. *J Cell Biol* **108**: 1195-207.
- Anderson, C. W., R. C. Schmitt, J. E. Smart und J. B. Lewis.** (1984). Early region 1B of adenovirus 2 encodes two coterminal proteins of 495 and 155 amino acid residues. *J. Virol.* **50**: 387-396.
- Ankerst, J. und N. Jonsson.** (1989). Adenovirus type 9-induced tumorigenesis in the rat mammary gland related to sex hormonal state. *J. Natl. Cancer Inst.* **81**: 294-298.
- Araujo, F. D., T. H. Stracker, C. T. Carson, D. V. Lee und M. D. Weitzman.** (2005). Adenovirus type 5 E4orf3 protein targets the Mre11 complex to cytoplasmic aggresomes. *J Virol* **79**: 11382-91.
- Aspegren, A., C. Rabino und E. Bridge.** (1998). Organization of splicing factors in adenovirus-infected cells reflects changes in gene expression during the early to late phase transition. *Exp. Cell Res.* **245**: 203-213.
- Aspegren, A. und E. Bridge.** (2002). Release of snRNP and RNA from transcription sites in adenovirus-infected cells. *Exp Cell Res* **276**: 273-83.
- Babich, A., L. T. Feldman, J. R. Nevins, J. E. Darnell und C. Weinberger.** (1983). Effect of adenovirus on metabolism of specific host mRNAs: transport control and specific translation discrimination. *Mol. Cell. Biol.* **3**: 1212-1221.
- Babiss, L. E. und H. S. Ginsberg.** (1984). Adenovirus type 5 early region 1b gene product is required for efficient shutoff of host protein synthesis. *J. Virol.* **50**: 202-212.
- Babiss, L. E., H. S. Ginsberg und J. J. Darnell.** (1985). Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 2552-2558.
- Bachi, A., I. C. Braun, J. P. Rodrigues, N. Panté, K. Ribbeck, C. von Kobbe, U. Kutay, M. Wilm, D. Görlich, M. Carmo-Fonseca und E. Izaurralde.** (2000). The C-terminal domain of TAP interacts with the nuclear pore complex and promotes export of specific CTE-bearing RNA substrates. *RNA* **6**: 136-158.
- Bai, J., J. R. Brody, S. S. Kadkol und G. R. Pasternack.** (2001). Tumor suppression and potentiation by manipulation of pp32 expression. *Oncogene* **20**: 2153-60.

- Barker, D. D. und A. J. Berk.** (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.
- Bates, S. und K. H. Vousden.** (1996). p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* **6**: 12-8.
- Beck, K. F., I. Stathopoulos, M. G. Berninger und M. Schweizer.** (1993). Overcoming GC compression in nucleotide sequencing. *Biotechniques* **14**: 375.
- Beltz, G. A. und S. J. Flint.** (1979). Inhibition of HeLa cell protein synthesis during adenovirus infection: restriction of cellular messenger RNA sequences to the nucleus. *J. Mol. Biol.* **131**: 353-373.
- Benkö, M., P. Elo, K. Ursu, W. Ahne, S. E. LaPatra, D. Thomson und B. Harrach.** (2002). First molecular evidence for the existence of distinct fish and snake adenoviruses. *J Virol* **76**: 10056-9.
- Berezney, R. und D. S. Coffey.** (1974). Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem Biophys Res Commun* **60**: 1410-7.
- Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, G. Droguett, E. A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J. S. Hong, M. S. Horwitz, R. L. Crowell und R. W. Finberg.** (1997). Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**: 1320-1323.
- Bernards, R., M. J. Vaessen, A. J. van der Eb und J. S. Sussenbach.** (1983). Construction and characterization of an adenovirus type 5/adenovirus type 12 recombinant virus. *Virology* **131**: 30-38.
- Bischoff, J. R., D. H. Kirn, A. Williams, C. Heise, S. Horn, M. Muna, L. Ng, J. A. Nye, A. Sampson Johannes, A. Fattaey und F. McCormick.** (1996). An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* **274**: 373-376.
- Blanchette, P., C. Y. Cheng, Q. Yan, G. Ketner, D. A. Ornelles, T. Dobner, R. C. Conaway, J. W. Conaway und P. E. Branton.** (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.
- Blobel, G.** (1985). Gene gating: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 8527-8529.
- Boggio, R., R. Colombo, R. T. Hay, G. F. Draetta und S. Chiocca.** (2004). A mechanism for inhibiting the SUMO pathway. *Mol Cell* **16**: 549-61.
- Boivin, D., M. R. Morrison, R. C. Marcellus, E. Querido und P. E. Branton.** (1999). Analysis of synthesis, stability, phosphorylation, and interacting polypeptides of the 34-kilodalton product of open reading frame 6 of the early region 4 protein of human adenovirus type 5. *J. Virol.* **73**: 1245-1253.
- Bos, J. L., L. J. Polder, R. Bernards, P. I. Schrier, P. J. van den Elsen, A. J. van der Eb und H. van Ormondt.** (1981). The 2.2 kb E1b mRNA of human Ad12 and Ad5 codes for two tumor antigens

- starting at different AUG triplets. *Cell* **27**: 121-31.
- Bosher, J., A. Dawson und R. T. Hay.** (1992). Nuclear factor I is specifically targeted to discrete subnuclear sites in adenovirus type 2-infected cells. *J Virol* **66**: 3140-50.
- Boyer, J. L., K. Rohleder und G. Ketner.** (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.
- Braun, I. C., A. Herold, M. Rode, E. Conti und E. Izaurralde.** (2001). Overexpression of TAP/p15 heterodimers bypasses nuclear retention and stimulates nuclear mRNA export. *J Biol Chem* **276**: 20536-43.
- Bray, M., S. Prasad, J. W. Dubay, E. Hunter, K. T. Jeang, D. Rekosh und M. L. Hammarskjold.** (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**: 1256-60.
- Brennan, C. M., I. E. Gallouzi und J. A. Steitz.** (2000). Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNAs in vivo. *J Cell Biol* **151**: 1-14.
- Brennan, C. M. und J. A. Steitz.** (2001). HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* **58**: 266-77.
- Bridge, E. und G. Ketner.** (1989). Redundant control of adenovirus late gene expression by early region 4. *J. Virol.* **63**: 631-638.
- Bridge, E. und G. Ketner.** (1990). Interaction of adenoviral E4 and E1b products in late gene expression. *Virology* **174**: 345-353.
- Bridge, E., M. Carmo-Fonseca, A. Lamond und U. Pettersson.** (1993a). Nuclear organization of splicing small nuclear ribonucleoproteins in adenovirus-infected cells. *J. Virol.* **76**: 5792-5802.
- Bridge, E., S. Medghalchi, S. Ubol, M. Leesong und G. Ketner.** (1993b). Adenovirus early region 4 and viral DNA synthesis. *Virology* **193**: 794-801.
- Bridge, E., D. X. Xia, M. Carmo-Fonseca, B. Cardinali, A. I. Lamond und U. Pettersson.** (1995). Dynamic organization of splicing factors in adenovirus-infected cells. *J Virol* **69**: 281-90.
- Bridge, E. und U. Pettersson.** (1996). Nuclear organization of adenovirus RNA biogenesis. *Exp. Cell Res.* **229**: 233-239.
- Bridge, E., K. U. Riedel, B. M. Johansson und U. Pettersson.** (1996). Spliced exons of adenovirus late RNAs colocalize with snRNP in a specific nuclear domain. *J. Cell. Biol.* **135**: 303-314.
- 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., S. 376-379, *Biotechniques*, vol. 5.

- Burgert, H. G. und J. H. Blusch.** (2000). Immunomodulatory functions encoded by the E3 transcription unit of adenoviruses. *Virus Genes* **21**: 13-25.
- Carney, J. P., R. S. Maser, H. Olivares, E. M. Davis, M. Le Beau, J. R. Yates, 3rd, L. Hays, W. F. Morgan und J. H. Petrini.** (1998). The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* **93**: 477-86.
- Carson, C. T., R. A. Schwartz, T. H. Stracker, C. E. Lilley, D. V. Lee und M. D. Weitzman.** (2003). The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. *Embo J* **22**: 6610-20.
- Carter, C. C., R. Izadpanah und E. Bridge.** (2003). Evaluating the role of CRM1-mediated export for adenovirus gene expression. *Virology* **315**: 224-233.
- Cathomen, T. und M. D. Weitzman.** (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.
- Chauvin, C., M. Suh, C. Remy und A. L. Benabid.** (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.
- Chen, I. H., K. S. Sciabica und R. M. Sandri-Goldin.** (2002). ICP27 interacts with the RNA export factor Aly/REF to direct herpes simplex virus type 1 intronless mRNAs to the TAP export pathway. *J Virol* **76**: 12877-89.
- Chen, I. H., L. Li, L. Silva und R. M. Sandri-Goldin.** (2005). ICP27 recruits Aly/REF but not TAP/NXF1 to herpes simplex virus type 1 transcription sites although TAP/NXF1 is required for ICP27 export. *J Virol* **79**: 3949-61.
- Chen, T. H., J. R. Brody, F. E. Romantsev, J. G. Yu, A. E. Kayler, E. Voneiff, F. P. Kuhajda und G. R. Pasternack.** (1996). Structure of pp32, an acidic nuclear protein which inhibits oncogene-induced formation of transformed foci. *Mol Biol Cell* **7**: 2045-56.
- Cook, J. L. und A. M. Lewis, Jr.** (1987). Immunological surveillance against DNA-virus-transformed cells: correlations between natural killer cell cytolytic competence and tumor susceptibility of athymic rodents. *J Virol* **61**: 2155-61.
- Corbin-Lickfett, K. A. und E. Bridge.** (2003). Adenovirus E4-34kDa requires active proteasomes to promote late gene expression. *Virology* **315**: 234-244.
- Cuesta, R., Q. Xi und R. J. Schneider.** (2000). Adenovirus-specific translation by displacement of kinase Mnk1 from cap-initiation complex eIF4F. *EMBO J* **19**: 3465-3474.
- Cuesta, R., Q. Xi und R. J. Schneider.** (2004). Structural basis for competitive inhibition of eIF4G-Mnk1 interaction by the adenovirus 100-kilodalton protein. *J. Virol.* **78**: 7707-7716.
- Cullen, B. R.** (2003a). Nuclear RNA export. *J Cell Sci* **116**: 587-97.

- Cullen, B. R.** (2003b). Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends Biochem Sci* **28**: 419-24.
- Cutt, J. R., T. Shenk und P. Hearing.** (1987). Analysis of adenovirus early region 4-encoded polypeptides synthesized in productively infected cells. *J. Virol.* **61**: 543-552.
- D'Amours, D. und S. P. Jackson.** (2002). The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 317-27.
- Davison, A. J., M. Benko und B. Harrach.** (2003). Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol* **84**: 2895-908.
- Debbas, M. und E. White.** (1993). Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev.* **7**: 546-554.
- Defer, C., M. T. Belin, M. L. Caillet-Boudin und P. Boulanger.** (1990). Human adenovirus-host cell interactions: comparative study with members of subgroups B and C. *J Virol* **64**: 3661-73.
- Dix, I. und K. N. Leppard.** (1993). Regulated splicing of adenovirus type 5 E4 transcripts and regulated cytoplasmic accumulation of E4 mRNA. *J. Virol.* **67**: 3226-3231.
- Dobbelstein, M., J. Roth, W. T. Kimberly, A. J. Levine und T. Shenk.** (1997). Nuclear export of the E1B 55-kDa and E4 34-kDa adenoviral oncoproteins mediated by a rev-like signal sequence. *EMBO J.* **16**: 4276-4284.
- Dobner, T. und J. Kzhyshkowska.** (2001). Nuclear export of adenovirus RNA. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **259**: 25-54.
- Dolph, P. J., V. Racaniello, A. Villamarin, F. Palladino und R. J. Schneider.** (1988). The adenovirus tripartite leader may eliminate the requirement for cap-binding protein complex during translation initiation. *J. Virol.* **62**: 2059-2066.
- Dolph, P. J., J. T. Huang und R. J. Schneider.** (1990). Translation by the adenovirus tripartite leader: elements which determine independence from cap-binding protein complex. *J. Virol.* **64**: 2669-2677.
- Dosch, T., F. Horn, G. Schneider, F. Krätzer, T. Dobner, J. Hauber und R. H. Stauber.** (2001). The adenovirus type 5 E1B-55K oncoprotein actively shuttles in virus-infected cells, whereas transport of E4orf6 is mediated by a CRM1 independent-mechanism. *J. Virol.* **75**: 5677-5683.
- Doucas, V., A. M. Ishov, A. Romo, H. Juguilon, M. D. Weitzman, R. M. Evans und G. G. Maul.** (1996). Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure. *Genes Dev.* **10**: 196-207.
- Dulbecco, R. und G. Freeman.** (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology* **8**: 396-7.
- Duprez, E., A. J. Saurin, J. M. Desterro, V. Lallemand-Breitenbach, K. Howe, M. N. Boddy, E. Solomon, H. de The, R. T. Hay und P. S. Freemont.** (1999). SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *J Cell Sci* **112** ( Pt

- 3): 381-93.
- Enders, J. F., J. A. Bell und J. H. Dingle.** (1956). "Adenoviruses": group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science* **124**: 119-120.
- Endter, C., J. Kzhyshkowska, R. Stauber und T. Dobner.** (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.
- Endter, C.** (2002). Identifizierung regulatorischer Bereiche im E1B-55K-Protein von Adenovirus Serotyp 5 und ihre Rolle bei der Transformation. Dissertation, Universität Regensburg.
- Endter, C. und T. Dobner.** (2004). Cell transformation by human adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **273**: 163-214.
- Erkmann, J. A. und U. Kutay.** (2004). Nuclear export of mRNA: from the site of transcription to the cytoplasm. *Exp Cell Res* **296**: 12-20.
- Evans, J. D. und P. Hearing.** (2003). Distinct Roles of the Adenovirus E4 ORF3 Protein in Viral DNA Replication and Inhibition of Genome Concatenation. *J. Virol.* **77**: 5295-5304.
- Evans, J. D. und P. Hearing.** (2005). Relocalization of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex by the adenovirus E4 ORF3 protein is required for viral replication. *J Virol* **79**: 6207-15.
- Fallaux, F. J., O. Kranenburg, S. J. Cramer, A. Houweling, H. Van Ormondt, R. C. Hoeben und A. J. Van Der Eb.** (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.
- Fan, X. C. und J. A. Steitz.** (1998). HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15293-8.
- Farmer, G., H. Bargonetti, H. Zhu, P. Friedman, R. Prywes und C. Prives.** (1992). Wild-type p53 activates transcription in vitro. *Nature* **358**: 83-86.
- Fischer, U., J. Huber, W. C. Boelens, I. W. Mattaj und R. Luhrmann.** (1995). The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* **82**: 475-83.
- Flint, S. J. und R. A. Gonzalez.** (2003). Regulation of mRNA production by the adenoviral E1B 55-kDa and E4 Orf6 proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **272**: 287-330.
- Flint, S. J., W. Huang, J. Goodhouse und S. Kyin.** (2005). A peptide inhibitor of exportin1 blocks shuttling of the adenoviral E1B 55 kDa protein but not export of viral late mRNAs. *Virology* **337**: 7-17.
- Fourney, R. M., K. D. Dietrich und M. C. Paterson.** (1989). Rapid DNA extraction and sensitive alkaline blotting protocol: application for detection of gene rearrangement and amplification for clinical molecular diagnosis. *Dis Markers* **7**: 15-26.



- Freedman, D. A. und A. J. Levine.** (1998). Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 7288-7293.
- Fribourg, S., I. C. Braun, E. Izaurralde und E. Conti.** (2001). Structural basis for the recognition of a nucleoporin FG repeat by the NTF2-like domain of the TAP/p15 mRNA nuclear export factor. *Mol Cell* **8**: 645-56.
- Gabler, S., H. Schütt, P. Groitl, H. Wolf, T. Shenk und T. Dobner.** (1998). E1B 55-kilodalton-associated protein: a cellular protein with RNA-binding activity implicated in nucleocytoplasmic transport of adenovirus and cellular mRNAs. *J. Virol.* **72**: 7960-7971.
- Gallouzi, I. E., C. M. Brennan und J. A. Steitz.** (2001). Protein ligands mediate the CRM1-dependent export of HuR in response to heat shock. *Rna* **7**: 1348-61.
- Gallouzi, I. E. und J. A. Steitz.** (2001). Delineation of mRNA export pathways by the use of cell-permeable peptides. *Science* **294**: 1895-901.
- Gallouzi, I. E., C. M. Brennan und J. A. Steitz.** (2003). Protein ligands mediate the CRM1-dependent export of HuR in response to heat shock. *Rna* **9**: 1410.
- Gama-Carvalho, M., I. Condado und M. Carmo-Fonseca.** (2003). Regulation of adenovirus alternative RNA splicing correlates with a reorganization of splicing factors in the nucleus. *Exp Cell Res* **289**: 77-85.
- Gatfield, D. und E. Izaurralde.** (2002). REF1/Aly and the additional exon junction complex proteins are dispensable for nuclear mRNA export. *J Cell Biol* **159**: 579-88.
- Gaynor, R. B., D. Hillman und A. J. Berk.** (1984). Adenovirus early region 1A protein activates transcription of a novel gene introduced into mammalian cells by infection or transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 1193-1197.
- Gey, G. O., W. D. Coffman und M. T. Kubicek.** (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12L**: 264.
- Giard, R. J., S. A. Aaronson, G. J. Todaro, P. Arnstein, J. H. Kersey, H. Dosik und W. P. Parks.** (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.
- Ginsberg, D., F. Mehta, M. Yaniv und M. Oren.** (1991). Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9979-9983.
- Gonzalez, R. A. und S. J. Flint.** (2002). Effects of mutations in the adenoviral E1B 55-kilodalton protein coding sequence on viral late mRNA metabolism. *J. Virol.* **76**: 4507-4519.
- Gooding, L. R. und W. S. Wold.** (1990). Molecular mechanisms by which adenoviruses counteract antiviral immune defenses. *Crit. Rev. Immunol.* **10**: 53-71.
- Goodrum, F. D. und D. A. Ornelles.** (1997). The early region 1B 55-kilodalton oncoprotein of

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- adenovirus relieves growth restrictions imposed on viral replication by the cell cycle. *J. Virol.* **71**: 548-561.
- Goodrum, F. D. und D. A. Ornelles.** (1998). p53 status does not determine outcome of E1B 55-Kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *J. Virol.* **72**: 9479-9490.
- Goodrum, F. D. und D. A. Ornelles.** (1999). Roles for the E4 orf6, orf3, and E1B 55-kilodalton proteins in cell cycle-independent adenovirus replication. *J. Virol.* **73**: 7474-7488.
- Graham, F. L. und A. J. van der Eb.** (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* **54**: 536-9.
- Graham, F. L.** (1984). Transformation by and oncogenicity of human adenoviruses, S. 339-398. *In* H. S. Ginsberg (ed.), *The adenoviruses*. Plenum Press, New York.
- Grand, R. J. und P. H. Gallimore.** (1984). Adenovirus type 12 early region 1 proteins: a study of their subcellular localization and protein-protein interactions. *J. Gen. Virol.* **65**: 2149-2166.
- Grand, R. J., M. L. Grant und P. H. Gallimore.** (1994). Enhanced expression of p53 in human cells infected with mutant adenoviruses. *Virology* **203**: 229-240.
- Grand, R. J., T. Mustoe, S. Roberts und P. H. Gallimore.** (1995). The quaternary structure of the adenovirus 12 early region 1B 54K protein. *Virology* **207**: 255-259.
- Gruter, P., C. Taberner, C. von Kobbe, C. Schmitt, C. Saavedra, A. Bachi, M. Wilm, B. K. Felber und E. Izaurralde.** (1998). TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Mol Cell* **1**: 649-59.
- Haber, J. E.** (1998). The many interfaces of Mre11. *Cell* **95**: 583-6.
- Halbert, D. N., J. R. Cutt und T. Shenk.** (1985). Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *J. Virol.* **56**: 250-257.
- Hall, T. A.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**: 95-98.
- Harada, J. N. und A. J. Berk.** (1999). p53-independent and -dependent requirements for E1B-55k in adenovirus type 5 replication. *J. Virol.* **73**: 5333-5344.
- Harada, J. N., A. Shevchenko, D. C. Pallas und A. J. Berk.** (2002). Analysis of the adenovirus E1B-55K-anchored proteome reveals its link to ubiquitination machinery. *J. Virol.* **76**: 9194-9206.
- Harlow, E. und D. Lane.** (1988). S. 139-318, *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Härtl, B.** (2005). Analysen zum onkogenen Potenzial des E1B-55K-Proteins von Adenovirus Typ 5. Dissertation, Universität Regensburg.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

---

- Hauber, J.** (2001). Nuclear export mediated by the Rev/Rex class of retroviral Trans-activator proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* **259**: 55-76.
- Hay, R. T.** (2005). SUMO: a history of modification. *Mol. Cell* **18**: 1-12.
- Hearing, P. und T. Shenk.** (1985). Sequence-independent auto-regulation of the adenovirus type E1A transcription unit. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 3214-3221.
- Hellen, C. U. und P. Sarnow.** (2001). Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* **15**: 1593-612.
- Herold, A., M. Suyama, J. P. Rodrigues, I. C. Braun, U. Kutay, M. Carmo-Fonseca, P. Bork und E. Izaurralde.** (2000). TAP (NXF1) belongs to a multigene family of putative RNA export factors with a conserved modular architecture. *Mol Cell Biol* **20**: 8996-9008.
- Higashino, F., M. Aoyagi, A. Takahashi, M. Ishino, M. Taoka, T. Isobe, M. Kobayashi, Y. Totsuka, T. Kohgo und M. Shindoh.** (2005). Adenovirus E4orf6 targets pp32/LANP to control the fate of ARE-containing mRNAs by perturbing the CRM1-dependent mechanism. *J Cell Biol* **170**: 15-20.
- Hilleman, M. R. und J. H. Werner.** (1954). Recovery of new agents from patients with acute respiratory illness. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **85**: 183-188.
- Hobom, U. und M. Dobbstein.** (2004). E1B-55-kilodalton protein is not required to block p53-induced transcription during adenovirus infection. *J Virol* **78**: 7685-97.
- Horridge, J. J. und K. N. Leppard.** (1998). RNA-binding activity of the E1B 55-kilodalton protein from human adenovirus type 5. *J. Virol.* **72**: 9374-9379.
- Horwitz, M. S.** (1996). Adenoviruses, S. 2149-2171. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe und P. M. Howley (ed.), *Virology*, Third ed, vol. 2. Lippincott-Raven, New York.
- Huang, J. T. und R. J. Schneider.** (1990). Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis is prevented by the drug 2-aminopurine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 7115-9.
- Huang, J. T. und R. J. Schneider.** (1991). Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis involves inactivation of cap-binding protein. *Cell* **65**: 271-280.
- Huang, M. M. und P. Hearing.** (1989). Adenovirus early region 4 encodes two gene products with redundant effects in lytic infection. *J. Virol.* **63**: 2605-2615.
- Huang, W. und S. J. Flint.** (1998). The tripartite leader sequence of subgroup C adenovirus major late mRNAs can increase the efficiency of mRNA export. *J. Virol.* **72**: 225-235.
- Huebner, R. J., W. P. Rowe, T. G. Ward, R. H. Parrot und J. A. Bell.** (1954). Adenoidal-pharyngeal conjunctival agents. *N. Engl. J. Med.* **251**: 1077-1086.

- Hutton, F. G., A. S. Turnell, P. H. Gallimore und R. J. Grand.** (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.
- Imler, J. L., C. Chartier, D. Dreyer, A. Dieterle, M. Sainte Marie, T. Faure, A. Pavirani und M. Mehtali.** (1996). Novel complementation cell lines derived from human lung carcinoma A549 cells support the growth of E1-deleted adenovirus vectors. *Gene Ther.* **3**: 75-84.
- Ishov, A. M., A. G. Sotnikov, D. Negorev, O. V. Vladimirova, N. Neff, T. Kamitani, E. T. Yeh, J. F. Strauss, 3rd und G. G. Maul.** (1999). PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol* **147**: 221-34.
- Izaurrealde, E. und I. W. Mattaj.** (1995). RNA export. *Cell* **81**: 153-159.
- Izaurrealde, E.** (2002). A novel family of nuclear transport receptors mediates the export of messenger RNA to the cytoplasm. *Eur J Cell Biol* **81**: 577-84.
- Jackson, D. A., S. J. McCready und P. R. Cook.** (1981). RNA is synthesized at the nuclear cage. *Nature* **292**: 552-5.
- Jakoby, W. B. und I. H. Pastan.** (1979). Cell culture. Methods in enzymology. Academic press, Inc., San Diego, Carlifornia.
- Javier, R. T., K. Raska, Jr., G. J. Macdonald und T. Shenk.** (1991). Human adenovirus type 9-induced rat mammary tumors. *J. Virol.* **65**: 3192-3202.
- Jayaram, S. und E. Bridge.** (2005). Genome concatenation contributes to the late gene expression defect of an adenovirus E4 mutant. *Virology* **342**: 286-96.
- Johnson, E. S.** (2004). Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* **73**: 355-82.
- Jones, N. und T. Shenk.** (1979). Isolation of adenovirus type 5 host range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cells. *Cell* **17**: 683-689.
- Kamitani, T., H. P. Nguyen, K. Kito, T. Fukuda-Kamitani und E. T. Yeh.** (1998). Covalent modification of PML by the sentrin family of ubiquitin-like proteins. *J Biol Chem* **273**: 3117-20.
- Kao, C. C., P. R. Yew und A. J. Berk.** (1990). Domains required for in vitro association between the cellular p53 and the adenovirus 2 E1B 55K proteins. *Virology* **179**: 806-814.
- Kastan, M. B. und D. S. Lim.** (2000). The many substrates and functions of ATM. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 179-86.
- Katahira, J., K. Straßer, A. Podtelejnikov, M. Mann, J. U. Jung und E. Hurt.** (1999). The Mex67p-mediated nuclear export pathway is conserved from yeast to human. *EMBO J.* **18**: 2593-2609.

- Ketner, G., E. Bridge, A. Virtanen, C. Hemstrom und U. Pettersson.** (1989). Complementation of adenovirus E4 mutants by transient expression of E4 cDNA and deletion plasmids. *Nucl. Acids Res.* **17**: 3037-3048.
- Kindsmüller, K.** (2002). Molekularbiologische Charakterisierung von Mutanten des Adenovirus Typ 5 E1B-55kDa-Proteins. Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- Kirn, D. H. und F. McCormick.** (1996). Replicating viruses as selective cancer therapeutics. *Mol Med Today* **2**: 519-27.
- Koch, P., J. Gatfield, C. Lober, U. Hobom, C. Lenz-Stoppler, J. Roth und M. Dobbstein.** (2001). Efficient replication of adenovirus despite the overexpression of active and nondegradable p53. *Cancer Res* **61**: 5941-7.
- Koffa, M. D., J. B. Clements, E. Izaurralde, S. Wadd, S. A. Wilson, I. W. Mattaj und S. Kuersten.** (2001). Herpes simplex virus ICP27 protein provides viral mRNAs with access to the cellular mRNA export pathway. *Embo J* **20**: 5769-78.
- König, C., J. Roth und M. Dobbstein.** (1999). Adenovirus type 5 E4orf3 protein relieves p53 inhibition by E1B-55-kilodalton protein. *J. Virol.* **73**: 2253-2262.
- Kozak, M.** (2002). Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* **299**: 1-34.
- Krätzer, F., O. Rosorius, P. Heger, N. Hirschmann, T. Dobner, J. Hauber und R. H. Stauber.** (2000). The adenovirus type 5 E1B-55k oncoprotein is a highly active shuttle protein and shuttling is independent of E4orf6, p53 and Mdm2. *Oncogene* **19**: 850-857.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.
- Lallemand-Breitenbach, V., J. Zhu, F. Puvion, M. Koken, N. Honore, A. Doubeikovsky, E. Duprez, P. Pandolfi, E. Puvion, P. Freemont und H. de The.** (2001). Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *J. Exp. Med.* **193**: 1361-1371.
- Le Hir, H., E. Izaurralde, L. E. Maquat und M. J. Moore.** (2000). The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *Embo J* **19**: 6860-9.
- Lee, J. H. und T. T. Paull.** (2004). Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science* **304**: 93-6.
- Lee, J. H. und T. T. Paull.** (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* **308**: 551-4.
- Leppard, K. N. und T. Shenk.** (1989). The adenovirus E1B 55 kd protein influences mRNA transport via an intranuclear effect on RNA metabolism. *EMBO J.* **8**: 2329-2336.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

---

- Leppard, K. N.** (1993). Selective effects on adenovirus late gene expression of deleting the E1b 55K protein. *J. Gen. Virol.* **74**: 575-582.
- Leppard, K. N. und R. D. Everett.** (1999). The adenovirus type 5 E1b 55K and E4 Orf3 proteins associate in infected cells and affect ND10 components. *J. Gen. Virol.* **80**: 997-1008.
- Lethbridge, K. J., G. E. Scott und K. N. Leppard.** (2003). Nuclear matrix localization and SUMO-1 modification of adenovirus type 5 E1b 55K protein are controlled by E4 Orf6 protein. *J. Gen. Virol.* **84**: 259-268.
- Levine, A. J.** (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**: 323-331.
- Lewis, J. B. und C. W. Anderson.** (1987). Identification of adenovirus type 2 early region 1B proteins that share the same amino terminus as do the 495R and 155R proteins. *J Virol* **61**: 3879-88.
- Lin, X., B. Sun, M. Liang, Y. Y. Liang, A. Gast, J. Hildebrand, F. C. Brunicardi, F. Melchior und X. H. Feng.** (2003). Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding. *Mol Cell* **11**: 1389-96.
- Liu, Y., A. L. Colosimo, X. J. Yang und D. Liao.** (2000). Adenovirus E1B 55-kilodalton oncoprotein inhibits p53 acetylation by PCAF. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 5540-5553.
- Liu, Y., A. Shevchenko, A. Shevchenko und A. J. Berk.** (2005). Adenovirus exploits the cellular aggresome response to accelerate inactivation of the MRN complex. *J Virol* **79**: 14004-16.
- Logan, J. und T. Shenk.** (1984). Adenovirus tripartite leader sequence enhances translation of mRNAs late after infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 3655-3659.
- Lowe, S. W. und H. E. Ruley.** (1993). Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev.* **7**: 535-545.
- Lutz, P. und C. Keding.** (1996). Properties of the adenovirus IVa2 gene product, an effector of late-phase-dependent activation of the major late promoter. *J Virol* **70**: 1396-405.
- Ma, W. J., S. Cheng, C. Campbell, A. Wright und H. Furneaux.** (1996). Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein. *J Biol Chem* **271**: 8144-51.
- Mackey, J. K., P. M. Rigden und M. Green.** (1976). Do highly oncogenic group A human adenoviruses cause human cancer? Analysis of human tumors for adenovirus 12 transforming DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 4657-4661.
- Mackey, J. K., M. Green, W. S. M. Wold und P. Ridgen.** (1979). Analysis of human cancer DNA for DNA sequences of human adenovirus type 4. *J. Natl. Cancer Inst.* **62**: 23-26.
- Maizel, J. V., Jr., D. O. White und M. D. Scharff.** (1968). The polypeptides of adenovirus. II. Soluble proteins, cores, top components and the structure of the virion. *Virology* **36**: 126-36.

- Malek, S. N., A. I. Katumuluwa und G. R. Pasternack.** (1990). Identification and preliminary characterization of two related proliferation-associated nuclear phosphoproteins. *J Biol Chem* **265**: 13400-9.
- Martin, M. E. und A. J. Berk.** (1998). Adenovirus E1B 55K represses p53 activation in vitro. *J. Virol.* **72**: 3146-3154.
- Martin, M. E. und A. J. Berk.** (1999). Corepressor required for adenovirus E1B 55,000-molecular-weight protein repression of basal transcription. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 3403-3414.
- Marton, M. J., S. B. Baim, D. A. Ornelles und T. Shenk.** (1990). The adenovirus E4 17-kilodalton protein complexes with the cellular transcription factor E2F, altering its DNA-binding properties and stimulating E1A-independent accumulation of E2 mRNA. *J. Virol.* **64**: 2345-2359.
- Mathews, M. B. und T. Shenk.** (1991). Adenovirus virus-associated RNA and translation control. *J. Virol.* **65**: 5657-5662.
- Mathias, P., T. Wickham, M. Moore und G. Nemerow.** (1994). Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. *J Virol* **68**: 6811-4.
- Matilla, A. und M. Radrizzani.** (2005). The Anp32 family of proteins containing leucine-rich repeats. *Cerebellum* **4**: 7-18.
- Melchior, F.** (2000). SUMO - nonclassical ubiquitin. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **16**: 591-626.
- Mencinger, M., I. Panagopoulos, J. A. Contreras, F. Mitelman und P. Aman.** (1998). Expression analysis and chromosomal mapping of a novel human gene, APRIL, encoding an acidic protein rich in leucines. *Biochim Biophys Acta* **1395**: 176-80.
- Mitsudomi, T., S. M. Steinberg, M. M. Nau, D. Carbone, D. D'Amico, H. K. Bodner, H. K. Oie, R. I. Linnoila, J. L. Mulshine, J. D. Minna und A. F. Gazdar.** (1992). p53 gene mutations in non-small-lung cell cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene* **7**: 171-180.
- Modrow, S. und D. Falke.** (1997). *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Moore, M., J. Schaack, S. B. Baim, R. I. Morimoto und T. Shenk.** (1987). Induced heat shock mRNAs escape the nucleocytoplasmic transport block in adenovirus-infected HeLa cells. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 4505-4512.
- Moore, M., N. Horikoshi und T. Shenk.** (1996). Oncogenic potential of the adenovirus E4orf6 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 11295-11301.
- Müller, S., M. J. Matunis und A. Dejean.** (1998). Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J.* **17**: 61-70.

- Müller, S., C. Hoegel, G. Pyrowolakis und S. Jentsch.** (2001). SUMO, ubiquitin's mysterious cousins. *Nature* **2**: 202-210.
- Nevels, M., T. Spruss, H. Wolf und T. Dobner.** (1997). The adenovirus E4orf6 protein increases the tumorigenicity of transformed rat cells by destabilizing the p53 tumor suppressor.
- Nevels, M., T. Spruss, H. Wolf und T. Dobner.** (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., B. Täuber, E. Kremmer, T. Spruss, H. Wolf und T. Dobner.** (1999b). Transforming potential of the adenovirus type 5 E4orf3 protein. *J. Virol.* **73**: 1591-1600.
- Nevels, M., S. Rubenwolf, T. Spruss, H. Wolf und T. Dobner.** (2000). Two distinct activities contribute to the oncogenic potential of the adenovirus type 5 E4orf6 protein. *J. Virol.* **74**: 5168-5181.
- Nevins, J. R. und P. K. Vogt.** (1996). Cell transformation by viruses, S. 301-343. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe und P. M. Howley (ed.), *Virology*, Third ed, vol. 1. Lippincott-Raven, New York.
- Nickerson, J.** (2001). Experimental observations of a nuclear matrix. *J Cell Sci* **114**: 463-74.
- O'Shea, C. C., L. Johnson, B. Bagus, S. Choi, C. Nicholas, A. Shen, L. Boyle, K. Pandey, C. Soria, J. Kunich, Y. Shen, G. Habets, D. Ginzinger und F. McCormick.** (2004). Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity. *Cancer Cell* **6**: 611-623.
- Ornelles, D. A. und T. Shenk.** (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.
- Pardo-Mateos, A. und C. S. Young.** (2004a). A 40 kDa isoform of the type 5 adenovirus IVa2 protein is sufficient for virus viability. *Virology* **324**: 151-64.
- Pardo-Mateos, A. und C. S. Young.** (2004b). Adenovirus IVa2 protein plays an important role in transcription from the major late promoter in vivo. *Virology* **327**: 50-9.
- Paull, T. T. und J. H. Lee.** (2005). The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM. *Cell Cycle* **4**: 737-40.
- Petrini, J. H.** (1999). The mammalian Mre11-Rad50-nbs1 protein complex: integration of functions in the cellular DNA-damage response. *Am J Hum Genet* **64**: 1264-9.
- Pichler, A. und F. Melchior.** (2002). Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmic transport. *Traffic* **3**: 381-7.
- Pilder, S., K. Leppard, J. Logan und T. Shenk.** (1986a). Functional analysis of the adenovirus E1B 55K polypeptide. *Cancer Cells* **4**: 285-290.



- Pilder, S., M. Moore, J. Logan und T. Shenk.** (1986b). The adenovirus E1B-55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 470-476.
- Pombo, A., J. Ferreira, E. Bridge und M. Carmo-Fonseca.** (1994). Adenovirus replication and transcription sites are spatially separated in the nucleus of infected cells. *EMBO J.* **13**: 5075-5085.
- Punga, T. und G. Akusjärvi.** (2000). The adenovirus-2 E1B-55K protein interacts with a mSin3A/histone deacetylase 1 complex. *FEBS Lett.* **476**: 248-252.
- Puvion-Dutilleul, F., J. Pedron und C. Cajean-Feroldi.** (1984). Identification of intranuclear structures containing the 72K DNA-binding protein of human adenovirus type 5. *Eur J Cell Biol* **34**: 313-22.
- Puvion-Dutilleul, F. und E. Puvion.** (1990a). Analysis by in situ hybridization and autoradiography of sites of replication and storage of single- and double-stranded adenovirus type 5 DNA in lytically infected HeLa cells. *J Struct Biol* **103**: 280-9.
- Puvion-Dutilleul, F. und E. Puvion.** (1990b). Replicating single-stranded adenovirus type 5 DNA molecules accumulate within well-delimited intranuclear areas of lytically infected HeLa cells. *Eur J Cell Biol* **52**: 379-88.
- Puvion-Dutilleul, F. und E. Puvion.** (1991). Sites of transcription of adenovirus type 5 genomes in relation to early viral DNA replication in infected HeLa cells: a high resolution in situ hybridization and autoradiographical study. *Biol. Cell.* **71**: 135-147.
- Puvion-Dutilleul, F. und E. Pichard.** (1992). Segregation of viral double-stranded and single-stranded DNA molecules in nuclei of adenovirus infected cells as revealed by electron microscope in situ hybridization. *Biol Cell* **76**: 139-50.
- Puvion-Dutilleul, F., R. Roussev und E. Puvion.** (1992). Distribution of viral RNA molecules during the adenovirus type 5 infectious cycle in HeLa cells. *J Struct Biol* **108**: 209-20.
- Puvion-Dutilleul, F., J. P. Bachellerie, N. Visa und E. Puvion.** (1994). Rearrangements of intranuclear structures involved in RNA processing in response to adenovirus infection. *J Cell Sci* **107 ( Pt 6)**: 1457-68.
- Puvion-Dutilleul, F., M. K. Chelbi-Alix, M. Koken, F. Quignon, E. Puvion und H. de The.** (1995). Adenovirus infection induces rearrangements in the intranuclear distribution of the nuclear body-associated PML protein. *Exp. Cell Res.* **218**: 9-16.
- Querido, E., R. C. Marcellus, A. Lai, C. Rachel, J. G. Teodoro, G. Ketner und P. E. Branton.** (1997). Regulation of p53 levels by the E1B 55-kilodalton protein and E4orf6 in adenovirus-infected cells. *J. Virol.* **71**: 3788-3798.
- Querido, E., P. Blanchette, Q. Yan, T. Kamura, M. Morrison, D. Boivin, W. G. Kaelin, R. C. Conaway, J. W. Conaway und P. E. Branton.** (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., M. R. Morisson, H. Chu-Pham-Dang, S. W. Thirlwell, D. Boivin und P. E. Branton.** (2001b). Identification of three functions of the adenovirus E4orf6 protein that mediate p53 degradation by the E4orf6-E1B55K complex. *J. Virol.* **75**: 699-709.
- Rabino, C., A. Aspegren, K. Corbin-Lickfett und E. Bridge.** (2000). Adenovirus late gene expression does not require a rev-like nuclear RNA export pathway. *J. Virol.* **74**: 6684-6688.
- Rangasamy, D., K. Woytek, S. A. Khan und V. G. Wilson.** (2000). SUMO-1 modification of bovine papillomavirus E1 protein is required for intranuclear accumulation. *J. Biol. Chem.* **275**: 37999-38004.
- Rao, L., M. Debbas, P. Sabbatini, D. Hockenbery, S. Korsmeyer und E. White.** (1992). The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7742-7746.
- Raska, K., Jr. und P. H. Gallimore.** (1982). An inverse relation of the oncogenic potential of adenovirus-transformed cells and their sensitivity to killing by syngeneic natural killer cells. *Virology* **123**: 8-18.
- Rebelo, L., F. Almeida, C. Ramos, K. Bohmann, A. I. Lamond und M. Carmo Fonseca.** (1996). The dynamics of coiled bodies in the nucleus of adenovirus-infected cells. *Mol. Biol. Cell.* **7**: 1137-1151.
- Reich, N. C., P. Sarnow, E. Duprey und A. J. Levine.** (1983). Monoclonal antibodies which recognize native and denatured forms of the adenovirus DNA-binding protein. *Virology* **128**: 480-484.
- Ridgway, P. J., A. R. Hall, C. J. Myers und A. W. Braithwaite.** (1997). p53/E1b58kDa complex regulates adenovirus replication. *Virology* **237**: 404-413.
- Rodrigues, J. P., M. Rode, D. Gatfield, B. J. Blencowe, M. Carmo-Fonseca und E. Izaurralde.** (2001). REF proteins mediate the export of spliced and unspliced mRNAs from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 1030-5.
- Rosas-Acosta, G., M. A. Langereis, A. Deyrieux und V. G. Wilson.** (2005). Proteins of the PIAS family enhance the sumoylation of the papillomavirus E1 protein. *Virology* **331**: 190-203.
- Roth, J., C. König, S. Wienzek, S. Weigel, S. Ristea und M. Döbelstein.** (1998). 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., A. Hengstermann, N. J. Whitaker, M. Scheffner und H. zur Hausen.** (1998). Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J. Virol.* **72**: 9470-9478.
- Rowe, W. P., R. J. Huebner, L. K. Gilmore, R. H. Parrott und T. G. Ward.** (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* **84**: 570-3.

- Royds, J. A., M. Hibma, B. R. Dix, L. Hananeia, I. A. Russell, A. Wiles, D. Wynford-Thomas und A. W. Braithwaite.** (2006). p53 promotes adenoviral replication and increases late viral gene expression. *Oncogene* **25**: 1509-20.
- Rubenwolf, S., H. Schütt, M. Nevels, H. Wolf und T. Dobner.** (1997). Structural analysis of the adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton-E4orf6 protein complex. *J. Virol.* **71**: 1115-1123.
- Ryan, K. M., A. C. Phillips und K. H. Vousden.** (2001). Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 332-7.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis und H. A. Erlich.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-91.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis.** (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sandler, A. B. und G. Ketner.** (1989). Adenovirus early region 4 is essential for normal stability of late nuclear RNAs. *J. Virol.* **63**: 624-630.
- Sandler, A. B. und G. Ketner.** (1991). The metabolism of host RNAs in cells infected by an adenovirus E4 mutant. *Virology* **181**: 319-326.
- Santos-Rosa, H., H. Moreno, G. Simos, A. Segref, B. Fahrenkrog, N. Pante und E. Hurt.** (1998). Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores. *Mol Cell Biol* **18**: 6826-38.
- Sarnow, P., Y. S. Ho, J. Williams und A. J. Levine.** (1982a). 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.
- Sarnow, P., C. A. Sullivan und A. J. Levine.** (1982b). A monoclonal antibody detecting the adenovirus type 5-E1b-58Kd tumor antigen: characterization of the E1b-58Kd tumor antigen in adenovirus-infected and -transformed cells. *Virology* **120**: 510-517.
- Sarnow, P., P. Hearing, C. W. Anderson, D. N. Halbert, T. Shenk und A. J. Levine.** (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.
- Segref, A., K. Sharma, V. Doye, A. Hellwig, J. Huber, R. Luhrmann und E. Hurt.** (1997). Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)<sup>+</sup> RNA and nuclear pores. *Embo J* **16**: 3256-71.
- Seo, S. B., P. McNamara, S. Heo, A. Turner, W. S. Lane und D. Chakravarti.** (2001). Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. *Cell* **104**: 119-30.
- Shen, Y., G. Kitzes, J. A. Nye, A. Fattaey und T. Hermiston.** (2001). Analyses of single-amino-acid substitution mutants of adenovirus type 5 E1B-55K protein. *J. Virol.* **75**: 4297-4307.

- Shenk, T.** (2001). Adenoviridae: the viruses and their replication, S. 2265-2300. *In* D. M. Knipe und P. M. Howley (ed.), *Virology*, Fourth ed, vol. 2. Lippincott-Raven, New York.
- Shepard, R. N. und D. A. Ornelles.** (2003). E4orf3 is necessary for enhanced S-phase replication of cell cycle-restricted subgroup C adenoviruses. *J. Virol.* **77**: 8593-8595.
- Shepard, R. N. und D. A. Ornelles.** (2004). Diverse roles for E4orf3 at late times of infection revealed in an E1B 55-kilodalton protein mutant background. *J. Virol.* **78**: 9924-9935.
- Shiloh, Y.** (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* **3**: 155-68.
- Smiley, J. K., M. A. Young und S. J. Flint.** (1990). Intranuclear location of the adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton protein. *J. Virol.* **64**: 4558-4564.
- Soule, H. D., J. Vazquez, A. Long, S. Albert und M. Brennan.** (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**: 1409-1416.
- Steeenga, W. T., N. Riteco, A. G. Jochemsen, F. J. Fallaux und J. L. Bos.** (1998). The large E1B protein together with the E4orf6 protein target p53 for active degradation in adenovirus infected cells. *Oncogene* **16**: 349-357.
- Stewart, P. L., S. D. Fuller und R. M. Burnett.** (1993). Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *Embo J* **12**: 2589-99.
- Stracker, T. H., C. T. Carson und M. D. Weitzman.** (2002). Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11 Rad50 NBS1 DNA repair complex. *Nature* **418**: 348-352.
- Stracker, T. H., D. V. Lee, C. T. Carson, F. D. Araujo, D. A. Ornelles und M. D. Weitzman.** (2005). Serotype-specific reorganization of the Mre11 complex by adenoviral E4orf3 proteins. *J Virol* **79**: 6664-73.
- Stutz, F., A. Bachi, T. Doerks, I. C. Braun, B. Seraphin, M. Wilm, P. Bork und E. Izaurralde.** (2000). REF, an evolutionary conserved family of hnRNP-like proteins, interacts with TAP/Mex67p and participates in mRNA nuclear export. *Rna* **6**: 638-50.
- Sugawara, K., Z. Gilead, W. S. Wold und M. Green.** (1977). Immunofluorescence study of the adenovirus type 2 single-stranded DNA binding protein in infected and transformed cells. *J Virol* **22**: 527-39.
- Tao, W. und A. J. Levine.** (1999). Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 3077-3080.
- Täuber, B. und T. Dobner.** (2001a). Adenovirus early E4 genes in viral oncogenesis. *Oncogene* **20**: 7847-7854.
- Täuber, B. und T. Dobner.** (2001b). Molecular regulation and biological function of adenovirus early genes: the E4 ORFs. *Gene* **278**: 1-23.

- Teodoro, J. G., T. Halliday, S. G. Whalen, D. Takayasu, F. L. Graham und P. E. Branton.** (1994). Phosphorylation at the carboxy terminus of the 55-kilodalton adenovirus type 5 E1B protein regulates transforming activity. *J. Virol.* **68**: 776-786.
- Teodoro, J. G. und P. E. Branton.** (1997). Regulation of p53-dependent apoptosis, transcriptional repression, and cell transformation by phosphorylation of the 55-kilodalton E1B protein of human adenovirus type 5. *J. Virol.* **71**: 3620-3627.
- Thomas, D. L., J. Schaack, H. Vogel und R. T. Javier.** (2001). Several E4 region functions influence mammary tumorigenesis by human adenovirus type 9. *J. Virol.* **75**: 557-568.
- Trentin, J. J., Y. Yabe und G. Taylor.** (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.
- Tribouley, C., P. Lutz, A. Staub und C. Keding.** (1994). The product of the adenovirus intermediate gene IVa2 is a transcriptional activator of the major late promoter. *J Virol* **68**: 4450-7.
- Turnell, A. S., R. J. A. Grand und P. H. Gallimore.** (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.
- Virtanen, A. und U. Pettersson.** (1985). Organization of early region 1B of human adenovirus type 2: identification of four differentially spliced mRNAs. *J. Virol.* **54**: 383-391.
- Voelkerding, K. und D. F. Klessig.** (1986). Identification of two nuclear subclasses of the adenovirus type 5-encoded DNA-binding protein. *J Virol* **60**: 353-62.
- Vogelstein, B., D. Lane und A. J. Levine.** (2000). Surfing the p53 network. *Nature* **408**: 307-10.
- Vojtesek, B., J. Bartek, C. A. Midgley und D. P. Lane.** (1992). An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J. Immunol. Methods* **151**: 237-244.
- Vousden, K. H.** (1995). Regulation of the cell cycle by viral oncoproteins. *Semin Cancer Biol* **6**: 109-16.
- Vousden, K. H.** (2000). p53: death star. *Cell* **103**: 691-4.
- Vousden, K. H. und X. Lu.** (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* **2**: 594-604.
- Walensky, L. D., D. S. Coffey, T. H. Chen, T. C. Wu und G. R. Pasternack.** (1993). A novel M(r) 32,000 nuclear phosphoprotein is selectively expressed in cells competent for self-renewal. *Cancer Res* **53**: 4720-6.
- Weiden, M. D. und H. S. Ginsberg.** (1994). Deletion of the E4 region of the genome produces adenovirus DNA concatemers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 153-157.

- Weigel, S. und M. Dobbelstein.** (2000). The nuclear export signal within the E4orf6 protein of adenovirus type 5 supports virus replication and cytoplasmic accumulation of viral mRNA. *J. Virol.* **74**: 764-772.
- Weinberg, D. H. und G. Ketner.** (1986). Adenoviral early region 4 is required for efficient viral DNA replication and for late gene expression. *J. Virol.* **57**: 833-838.
- White, E.** (1998). Regulation of apoptosis by adenovirus E1A and E1B oncoproteins. *Semin. Virol.* **8**: 505-513.
- Wickham, T. J., P. Mathias, D. A. Cheresh und G. R. Nemerow.** (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* **73**: 309-19.
- Wickham, T. J., E. J. Filardo, D. A. Cheresh und G. R. Nemerow.** (1994). Integrin alpha v beta 5 selectively promotes adenovirus mediated cell membrane permeabilization. *J Cell Biol* **127**: 257-64.
- Wiegand, H. L., G. A. Coburn, Y. Zeng, Y. Kang, H. P. Bogerd und B. R. Cullen.** (2002). Formation of Tap/NXT1 heterodimers activates Tap-dependent nuclear mRNA export by enhancing recruitment to nuclear pore complexes. *Mol Cell Biol* **22**: 245-56.
- Williams, J., B. D. Karger, Y. S. Ho, C. L. Castiglia, T. Mann und S. J. Flint.** (1986). The adenovirus E1B 495R protein plays a role in regulating the transport and stability of the viral late messages. *Cancer Cells* **4**: 275-284.
- Williams, J., M. Williams, C. Liu und G. Telling.** (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.
- Wilson, V. G. und D. Rangasamy.** (2001). Intracellular targeting of proteins by sumoylation. *Exp. Cell Res.* **271**: 57-65.
- Wold, W. S., J. K. Mackey, P. Rigden und M. Green.** (1979). Analysis of human cancer DNA's for DNA sequence of human adenovirus serotypes 3, 7, 11, 14, 16, and 21 in group B1. *Cancer Res* **39**: 3479-84.
- Xi, Q., R. Cuesta und R. J. Schneider.** (2004). Tethering of eIF4G to adenoviral mRNAs by viral 100k protein drives ribosome shunting. *Genes Dev* **18**: 1997-2009.
- Xi, Q., R. Cuesta und R. J. Schneider.** (2005). Regulation of translation by ribosome shunting through phosphotyrosine-dependent coupling of adenovirus protein 100k to viral mRNAs. *J Virol* **79**: 5676-83.
- Yang, U. C., W. Huang und S. J. Flint.** (1996). mRNA export correlates with activation of transcription in human subgroup C adenovirus-infected cells. *J. Virol.* **70**: 4071-4080.
- Yew, P. R., C. C. Kao und A. J. Berk.** (1990). Dissection of functional domains in the adenovirus 2 early 1B 55K polypeptide by suppressor-linker insertional mutagenesis. *Virology* **179**: 795-805.

- Yew, P. R. und A. J. Berk.** (1992). Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature* **357**: 82-85.
- Yew, P. R., X. Liu und A. J. Berk.** (1994). Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. *Genes Dev.* **8**: 190-202.
- Yoder, S. S. und S. M. Berget.** (1986). Role of adenovirus type 2 early region 4 in the early-to-late switch during productive infection. *J. Virol.* **60**: 779-781.
- Yueh, A. und R. J. Schneider.** (2000). Translation by ribosome shunting on adenovirus and hsp70 mRNAs facilitated by complementarity to 18S rRNA. *Genes Dev* **14**: 414-21.
- Zeller, T.** (2004). In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen funktioneller Bereiche des Adenovirus Typ 5 E1B-55kDa-Proteins. Dissertation, Universität Regensburg.
- Zhang, H., H. Saitoh und M. J. Matunis.** (2002). Enzymes of the SUMO modification pathway localize to filaments of the nuclear pore complex. *Mol Cell Biol* **22**: 6498-508.
- Zhang, W. und M. J. Imperiale.** (2000). Interaction of the adenovirus IVa2 protein with viral packaging sequences. *J Virol* **74**: 2687-93.
- Zhang, W., J. A. Low, J. B. Christensen und M. J. Imperiale.** (2001). Role for the adenovirus IVa2 protein in packaging of viral DNA. *J Virol* **75**: 10446-54.
- Zhang, W. und M. J. Imperiale.** (2003). Requirement of the adenovirus IVa2 protein for virus assembly. *J Virol* **77**: 3586-94.
- Zhang, Y., D. Feigenbaum und R. J. Schneider.** (1994). A late adenovirus factor induces eIF-4E dephosphorylation and inhibition of cell protein synthesis. *J. Virol.* **68**: 7040-7050.
- Zhong, S., S. Muller, S. Ronchetti, P. S. Freemont, A. Dejean und P. P. Pandolfi.** (2000). Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* **95**: 2748-2752.
- Zhou, Z., M. J. Luo, K. Straesser, J. Katahira, E. Hurt und R. Reed.** (2000). The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans. *Nature* **407**: 401-5.
- Zhu, X. D., B. Kuster, M. Mann, J. H. Petrini und T. de Lange.** (2000). Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet* **25**: 347-52.

# Veröffentlichungen

---

---

## Publikationen in Fachzeitschriften

Kindsmüller, K., Groitl, P., Härtl, B., Blanchette, P., Hauber, J. und Dobner, T. (2006). SUMO1-conjugation regulates intranuclear targeting and CRM1-independent nuclear export of the adenovirus type 5 early region 1B 55K protein in productively infected cells. *EMBO J.* Zur Veröffentlichung eingereicht.

Kindsmüller, K., Groitl, P., Schreiner S. und Dobner, T. (2006). A 49K isoform of the adenovirus type 5 early region 1B 55K protein is sufficient to support virale replication. Manuskript in Vorbereitung.

Kindsmüller, K., Groitl, P., Blanchette, P. und Dobner, T. (2006). CRM1-dependent nuclear export function of the adenovirus type 5 E1B-55K/E4orf6-complex is not required for efficient viral replication. Manuskript in Vorbereitung.

Kindsmüller, K., Groitl und Dobner, T. (2006). Efficient replication of adenovirus type 5 is dependent on proteasomal degradation of p53 and Mre11. Manuskript in Vorbereitung.

## Vorträge auf Fachtagungen

Zeller, T., Kindsmüller, K., Groitl, P. und Dobner, T.: Analysis of human adenovirus type 5 E1B-55kDa nucleocytoplasmic shuttling functions in productive infection. *Small DNA Tumor Viruses Meeting, Madison/USA, 09.-14. Juli 2002.*

Zeller, T., Kindsmüller, K. und Dobner, T.: Analysis of human adenovirus type 5 E1B-55kDa nucleocytoplasmic shuttling functions in productive infection. *Small DNA Tumor Viruses Meeting, Triest, 15.-20. Juli 2003.*

Kindsmüller, K., Groitl, P., Zeller, T. und Dobner, T.: Analysis of human adenovirus type 5 E1B-55kDa and E4orf6 nucleocytoplasmic shuttling functions in productive infection. *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Tübingen, 17.-20. März 2004.*

Kindsmüller, K., Groitl, P., Zeller, T. und Dobner, T.: Analysis of human adenovirus type 5 E1B-55kDa and E4orf6 nucleocytoplasmic shuttling functions in productive infection. *Small DNA Tumor Viruses Meeting, Madison/USA, 13.-18. Juli 2004.*



Kinds Müller, K., Groitl, P. und Dobner, T.: Identification of functional domains in the adenovirus type 5 E1B-55K protein required for binding to and degradation of cellular Mre11. *Small DNA Tumor Viruses Meeting, Cambridge/England, 19.-24. Juli 2005.*

**Posterpräsentationen bei Fachtagungen**

Groitl, P., Dirlik, O., Zeller, T., Kinds Müller, K. und Dobner, T.: Efficient generation of E1 and E4 adenovirus type 5 mutants. *Small DNA Tumor Viruses Meeting, Madison/USA, 09.-14. Juli 2002.*

Kinds Müller, K., Groitl, P., Zeller, T. und Dobner, T.: Analysis of human adenovirus type 5 E1B-55K nucleocytoplasmic shuttling functions in productive infection. *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Hannover, 16.-19. März 2005.*

# Danksagung

---

---

*Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Februar 2003 und Mai 2006 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg angefertigt.*

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

*Herrn Prof. Dr. Charalampos Aslanidis danke ich vielmals für die Bereitschaft zur Übernahme des Erstgutachtens.*

*Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Thomas Dobner. Seine stete Diskussionsbereitschaft, sein Interesse an meiner Arbeit sowie seine tatkräftige Unterstützung haben sehr zum Gelingen dieses Projekts beigetragen.*

*Herrn Prof. Dr. Joachim Hauber vom Heinrich-Pette-Institut in Hamburg danke ich für die zur Verfügung gestellten Antikörper.*

*Allen ehemaligen und aktuellen dicken Dobners danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, die sehr gute Zusammenarbeit und das nette Arbeitsklima. Bei Peter Groitl möchte ich mich für die Hilfe beim Herstellen von Transposon-freien Virusmutanten bedanken. Barbara Härtl und Timo Sieber danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Insbesondere möchte ich mich bei Barbara, Sabrina und Hannah für die lustige und schöne Zeit sowohl im als auch außerhalb des Labors bedanken. Danke Barbara für deine Hilfsbereitschaft bei der Lösung verschiedenster Probleme und dafür dass du meistens zugleich mit mir Hunger hattest!*

*Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Vater, bei meiner Schwester Bärbl und meinem Freund Stefan für ihre Unterstützung sowie ihre Liebe und Geduld bedanken.*

