

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung)

**Etablierung und Charakterisierung einer humanen Zelllinie mit stabil integriertem E2<sub>Ad12</sub>/Reporterkonstrukt zum Studium der Regulation des E2-Promotors durch den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg**

**I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n**

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin

durch die Medizinische Fakultät

der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von

Christiane Margret Nolte

aus Bochum

2004

Dekan: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. K.-H. Jöckel  
1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Esche  
2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. A. Eggert

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Dezember 2004

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1    Adenoviren .....	9
1.2    Die produktive Infektion .....	11
1.3    Die abortive Infektion.....	13
1.4    Die E1A-Region des onkogenen Serotyps Ad12.....	15
1.5    Kontrolle der Genexpression durch E1A-Proteine.....	17
1.6    Der E2-Promotor des Adenovirus Serotyp 12.....	21
1.7    Der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg.....	24
1.7.1    Regulation des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges durch die E1A-Proteine.....	25
1.8    Chromatinstruktur und Regulation der Genexpression .....	27
1.9    Zielsetzung .....	29
<b>2. Material.....</b>	<b>31</b>
2.1    Chemikalien.....	31
2.2    Enzyme .....	32
2.3    Antikörper .....	33
2.4    Kits .....	33
2.5    Molekulargewichtsstandards .....	33

---

2.6	Lösungen und Materialien für die Zellkultur .....	34
2.7	Besondere Verbrauchsmaterialien.....	34
2.8	Spezielle Geräte.....	35
2.9	Puffer und Lösungen .....	35
2.10	Bakterienstämme .....	37
2.11	Zelllinien .....	37
2.12	Plasmide .....	38
2.13	Oligonukleotide.....	38
<b>3.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>40</b>
3.1	Allgemeines.....	40
3.2	Herstellung kompetenter Bakterien.....	40
3.3	Transformation kompetenter Bakterien.....	41
3.4	Isolierung von Nukleinsäuren.....	41
3.4.1	Präparation von Plasmid-DNA.....	41
3.4.2	Plasmid-DNA Maxi-Präparation.....	41
3.4.3	Plasmid-DNA Mini-Präparation.....	42
3.4.4	Präparation genomischer DNA aus Eukaryotenzellen .....	42
3.5	Modifikation von DNA .....	43
3.5.1	Restriktion von DNA mit Restriktionsenzymen .....	43
3.5.2	Ligation .....	43
3.6	Horizontale Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	44
3.7	Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	44

---

3.8	Amplifikation von DNA-Sequenzen .....	45
3.8.1	PCR (Polymerase Kettenreaktion) .....	45
3.8.2	Identifizierung Insert-positiver Bakterienklone mittels PCR-Screening .....	47
3.9	pBlue-TOPO TA Cloning® Kit (Version E) .....	48
3.10	Quality Control $\beta$ -Gal Assay Kit.....	49
3.11	Quality Control $\beta$ -Gal Staining Kit .....	49
3.12	Zellkultur .....	49
3.12.1	Kultivierung von Zelllinien .....	50
3.12.2	Passagieren von Zellen.....	50
3.12.3	Lagerung von Zellen.....	50
3.12.4	Koloniebildung Puromycin-resistenter Zellen .....	51
3.13	Transfektion von eukaryotischen Zellen .....	51
3.13.1	Lipofektion .....	52
3.13.2	Elektroporation .....	53
3.14	Bestimmung der CAT-Aktivität in Zellextrakten .....	53
3.15	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	56
3.16	Isolierung und Analyse von Proteinen.....	56
3.16.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	56
3.16.2	Western-Blot-Analysen (Harlow und Lane, 1988) .....	57
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>59</b>
4.1	Klonierung des E2 <sub>Ad12</sub> -WT-Promotors und verschiedener Promotor-	

---

mutanten in den Expressionsvektor pBlue-TOPO .....	59
4.1.1 Nachweis der Funktionalität des E2 <sub>Ad12</sub> -WT-Promotors und der vier von ihm abgeleiteten Mutanten im Reporterkonstrukt pBlue-TOPO .....	61
4.2 Struktur des E2 <sub>Ad12</sub> -Promotor/Reportergenkonstrukts pBL-E2 <sub>Ad12</sub> -WT/CAT und Nachweis seiner Funktionalität .....	63
4.3 Etablierung von Zelllinien mit kovalent in das Wirtsgenom integriertem pBL-E2 <sub>Ad12</sub> -WT/CAT Expressionsplasmid .....	65
4.3.1 Identifikation von Zellklonen mit kovalent integriertem pBL-E2 <sub>Ad12</sub> -WT/CAT-Expressionsvektor.....	67
4.3.2 Analyse der Aktivierung des kovalent in das Wirtsgenom integrierten E2 <sub>Ad12</sub> -WT-Promotors durch das E1A <sub>12S</sub> -Protein und die PKA-C $\alpha$ -Untereinheit .....	69
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>75</b>
5.1 Effizienz des Nachweises der E2 <sub>Ad12</sub> -Promotoraktivierung durch E1A und PKA-C $\alpha$ bei Verwendung unterschiedlicher Reportergenkonstrukte .....	76
5.2 Etablierung von Zelllinien mit kovalent in das Wirtsgenom integriertem E2 <sub>Ad12</sub> -WT/CAT-Promotor.....	78
5.3 Warum lässt sich der E2-Promotor im kovalent integrierten E2 <sub>Ad12</sub> -WT/CAT-Reporterkonstrukt in den verschiedenen Zellklonen unterschiedlich gut induzieren? .....	78

**6. Zusammenfassung..... 80**

**7. Literaturverzeichnis ..... 81**

**Abkürzungsverzeichnis..... 93**

**Danksagung**

**Lebenslauf**

## 1. Einleitung

Virus-Wirtszellsysteme werden seit vielen Jahren als Modellsysteme zur Untersuchung molekularer und zellbiologischer Prozesse eingesetzt. Insbesondere mit Hilfe des Adenovirus-Wirtszellsystems gewann man grundlegende Erkenntnisse über verschiedene makromolekulare Abläufe wie z.B. die Existenz von Introns (Berget et al., 1977) und das RNA-Spleißen (Bachenheimer und Darnell, 1975), die Verpackung von DNA mit Histonproteinen in Nukleosomen (Gariglio et al., 1979) und über die Regulation des Zellzyklus. Des Weiteren gewann man grundlegende Erkenntnisse über diverse zellzyklusregulierende Proteine (z.B. E2F-Familie (Koveshdi et al., 1986) und die, die E2F-Funktionen inhibierenden, Proteine Rb/p104, p107, p130) und über die eukaryotische Genexpression (als Übersichten s. Brockmann und Esche, 1995; Berk et al., 1998).

Über die Erkenntnisse der Regulation der Genexpression, der DNA-Replikation, der Proliferation, der Differenzierung und der Apoptose hinaus, fand man auch wichtige Einblicke in die Mechanismen der Tumorentstehung und -progression. So führte die Charakterisierung von RNA-Tumoviren (Retroviren) zur Identifikation von vielen zellulären Proto-Onkoproteinen. Dazu gehören z.B. die Proteintyrosin-Kinase Src (Martin, 1970; Czernilofsky et al., 1980), der Transkriptionsfaktor c-Jun (Maki et al., 1987) und der Transkriptionsfaktor c-Fos (Curran und Teich, 1982; Curran et al., 1983).

Die Identifizierung von Tumorsuppressorgenen wie dem Retinoblastom-Suszeptibilitäts-Gen (Rb/p105; Whyte et al., 1988) gelang durch die Charakterisierung von DNA-Tumoviren. Ihre Eigenschaft, eukaryotische Zellen transformieren zu können, weist vor allem DNA-Tumoviren, wie z.B. das Adenovirus-Wirtszellsystem als geeignetes Modell zur Untersuchung der Entstehung von Tumoren aus. Des Weiteren liegt eine neue

Perspektive für die Therapie maligner Erkrankungen in dem Einsatz adenoviraler Vektoren in der Gentherapie.

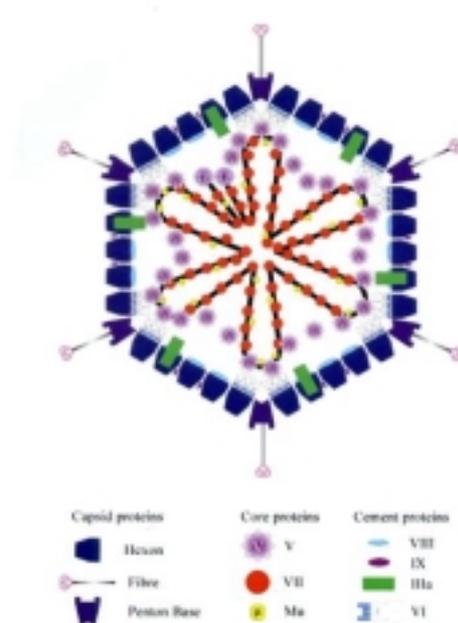
### **1.1 Adenoviren**

1953 wurden erstmals humanpathogene Adenoviren - aus operativ entferntem Rachenmandelgewebe von Kindern - durch Rowe und seine Mitarbeiter isoliert (Rowe et al., 1953). Beim Menschen verursachen Adenoviren meist harmlos verlaufende Infektionen des respiratorischen Traktes, des Gastrointestinaltraktes, der Augen und der Harnwege (Übersicht bei Horwitz 1990). In Nagetieren sind humanpathogene Adenoviren jedoch in der Lage, abhängig vom Serotyp Tumoren hervorzurufen. Da Adenoviren sich in humanen Zellen produktiv vermehren und die infizierten Zellen zerstören, ist es bisher nicht gelungen, einen kausalen Zusammenhang zwischen der Entstehung menschlicher Tumoren und der Infektion durch humanpathogene Adenoviren herbeizuführen. Zurzeit bestehen jedoch kontroverse Diskussionen über die Beteiligung der E1A-Onkoproteine der Adenoviren an der Entstehung des Ewing-Sarkoms (Sanchez-Prieto et al., 1999; Melot und Delattre, 1999; Kovar, 1999).

Inzwischen sind über 40 humanpathogene Adenovirus-Serotypen bekannt. Sie werden nach verschiedenen Kriterien, wie nach DNA-Sequenzhomologie, nach DNA-Fragmentmustern der viralen DNA, nach Verdau mit Restriktionsendonukleasen, nach Haemagglutinations-Reaktionen mit Ratten- und Rhesusaffenerythrozyten, nach dem Ausmaß der Onkogenität in Nagern und nach der Polypeptid-Zusammensetzung der Virionproteine in sechs Subgenera (A-F) eingeteilt (als Übersicht s. Bailey und Mautner, 1994). Adenoviren gehören zur Familie der Adenoviridae, die sich in die Gattungen der Aviadenovirus (Vögel-Adenovirus) und Mastadenovirus (Säuger-Adenovirus) (Norrby et al., 1976) gliedert.

Das Virion der Adenoviren besitzt keine Lipidmembranhülle und hat einen Durchmesser von 70-80nm. Das ikosaedrische Capsid umgibt eine lineare, doppelsträngige DNA von ca. 34kbp (Übersicht bei Flint und Broker, 1981). Das Capsid besteht aus 252 Capsomeren, davon gehören 240 zu den Hexacapsomeren und 12 zu den Pentoncapsomeren (siehe Abb. 1; Übersicht s. Philipson, 1983). Mit Hilfe so genannter Fiberproteine, die auf der Oberfläche der Pentoncapsomere verankert sind, kann sich das Virus an einem spezifischen Wirtszell-Rezeptor anheften (Adsorptions-Phase).

Dieser Vorgang erlaubt durch Pinozytose das Eindringen des Virus in die Zielzelle (Penetrations-Phase). Im nächsten Schritt („uncoating“) wird die Nukleinsäure aus dem Capsid freigesetzt und gelangt in den Zellkern. Da Adenoviren Zellen unterschiedlicher Spezies infizieren können, gibt es in Abhängigkeit von der Spezies der Zielzelle zwei verschiedene Infektions-Modi: die produktive Infektion permissiver, humaner Zellen und die abortive Infektion nicht-permissiver Zellen (z. B. Nagetierzellen).



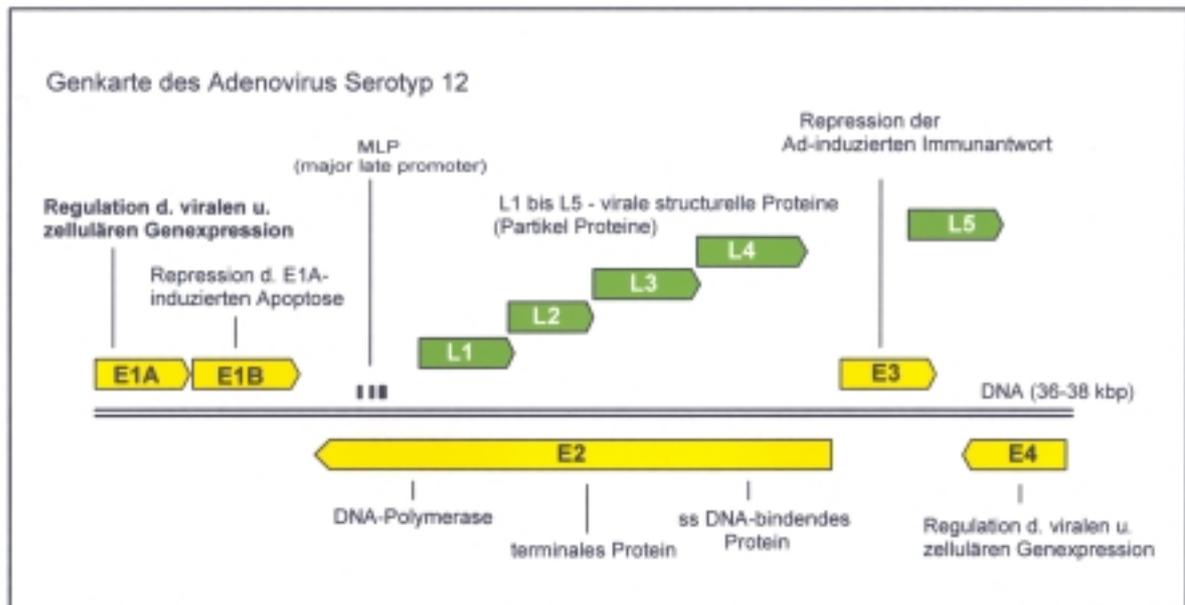
**Abb.1: Aufbau eines Adenovirus**

Das Capsid des Adenovirus ist aus den drei Capsid-bildenden Proteinen Hexon, Fiber und Penton-Base aufgebaut. Die Kernproteine V, VII und Mu liegen assoziiert mit der viralen DNA im Virion vor. Die Proteine VIII, IX, IIIa und VI dienen der Stabilität des Capsids (nach Russel, 2000).

## 1.2 *Die produktive Infektion*

Bei der produktiven Infektion einer humanen, permissiven Zelle durch humanpathogene Adenoviren (auch lytische Infektion genannt) werden alle Stadien einer Virusinfektion durchlaufen. Zuerst erfolgt die Adsorption an den Oberflächenrezeptor auf der Zellmembran, dann die Penetration durch die Zytoplasmamembran und das Uncoating. Die freigesetzte Virus-DNA wird dann in den Zellkern transportiert. Dort kommt es erst zur Expression sog. früher viraler Gene, dann zur Replikation der viralen DNA und Expression der späten viralen Gene. Nach dem Zusammenbau der neuen Viruspartikel werden die Viren (bis zu  $10^5$  Viren pro Zelle) durch Autolyse der absterbenden Wirtszelle freigesetzt (Flint und Broker, 1981).

Abhängig vom Zeitpunkt der Expression nach Infektion wird eine Gliederung der Transkriptionseinheiten des adenoviralen Genoms in frühe (E1-E4; „E“ für early) und späte (L1-L5; „L“ für late) Genregionen vorgenommen (siehe Abb. 2; Broker et. al.). Die späte Phase der Virusinfektion beginnt mit dem Start der viralen DNA-Replikation (meist 10-12 Stunden nach der Infektion). Die Genprodukte der frühen Regionen regulieren vor allem die makromolekularen Syntheseprozesse der Zelle, um eine effiziente Replikation des Virus zu gewährleisten und die Expression der frühen viralen Gene.



**Abb. 2 Schematische Darstellung der Organisation des Genoms humanpathogener Adenoviren (nach Watson et al., 1987).** Das lineare doppelsträngige DNA-Molekül der Adenoviren wird in „map units“ (1-100) unterteilt. Die Transkriptionseinheiten gliedern sich in frühe („E“ = early; E1-E4) und späte („L“ = late; L1-L5) Regionen. Die Regionen E1-E4 werden jeweils durch einen eigenen Promotor reguliert. Die späten Regionen L1-L5 stehen dagegen unter der Kontrolle eines Einzigen, des „major late promoters“. Wichtige Funktionen der entsprechenden Genprodukte sind der jeweiligen Region zugeordnet.

Die ersten frühen viralen Proteine der Region E1A fungieren als Transkriptionsfaktoren und regulieren zusammen mit zellulären Transkriptionsfaktoren die Expression aller adenoviralen Gene und vieler spezifischer zellulärer Gene (Übersicht siehe Brockmann und Esche, 1995). Die E1B-Region kodiert für Proteine, die unter anderem für die Akkumulation, Stabilisierung und Translation viraler mRNAs zuständig sind (Pilder et al., 1986; Zhang et al., 1995). Des Weiteren gehört die Inhibition der E1A-induzierten Apoptose zu einer essenziellen Funktion dieser Region (Übersicht bei White, 1995). Die Region E2 trägt die genetische Information für Proteine, die für die virale

DNA-Replikation notwendig sind. Hierbei handelt es sich um eine virale DNA-Polymerase, das „DNA-binding“ Protein (DBP) und das Terminale Protein (pTP) (Übersicht s. Swaminathan und Thimmapaya, 1995). Die Proteine der Region E3 supprimieren die zelluläre Immunantwort des Wirtsorganismus, z.B. durch Unterdrückung der Translokation der MHC-Klasse-I Antigene an die Zelloberfläche, wodurch eine Elimination der befallenen Zelle durch zytotoxische T-Lymphozyten weitgehend unterbunden wird (Horwitz et al., 1995). Die Proteine der Transkriptionseinheit E4 sind mit viralen (E1B) und zellulären Faktoren (E2F) an der viralen und zellulären Genexpression beteiligt. Außerdem sind sie für den Zusammenbau der Viruspartikel wichtig (Übersicht s. Shenk, 1996).

In der späten Phase (nach Beginn der DNA-Replikation) werden die späten viralen Regionen transkribiert, die unter der Kontrolle eines einzigen sog. „Major Late Promoters“ (MLP) stehen (Evans et al., 1977; Nevins und Darnell, 1978). In dieser späten Infektionsphase entstehen aus einer nukleären Vorläufer-RNA (hnRNA) durch alternatives Spleißen über 20 unterschiedliche mRNAs. Sie gliedern sich in die fünf Gruppen L1 bis L5 und beinhalten die genetische Information für virale Strukturproteine (Übersicht s. Flint und Broker, 1981). Anschließend erfolgt im Zellkern der Zusammenbau der Viruspartikelkomponenten und die Verpackung der viralen DNA in die Viruspartikel (Horwitz et al., 1969). Durch Autolyse der mit Viruspartikeln gefüllten Zelle werden die Viren frei.

### **1.3 Die abortive Infektion**

Im Gegensatz zur produktiven Infektion erfolgt bei der abortiven Infektion keine Produktion reifer Virusnachkommen (Doerfler, 1969). Werden nicht-permissive Zellen

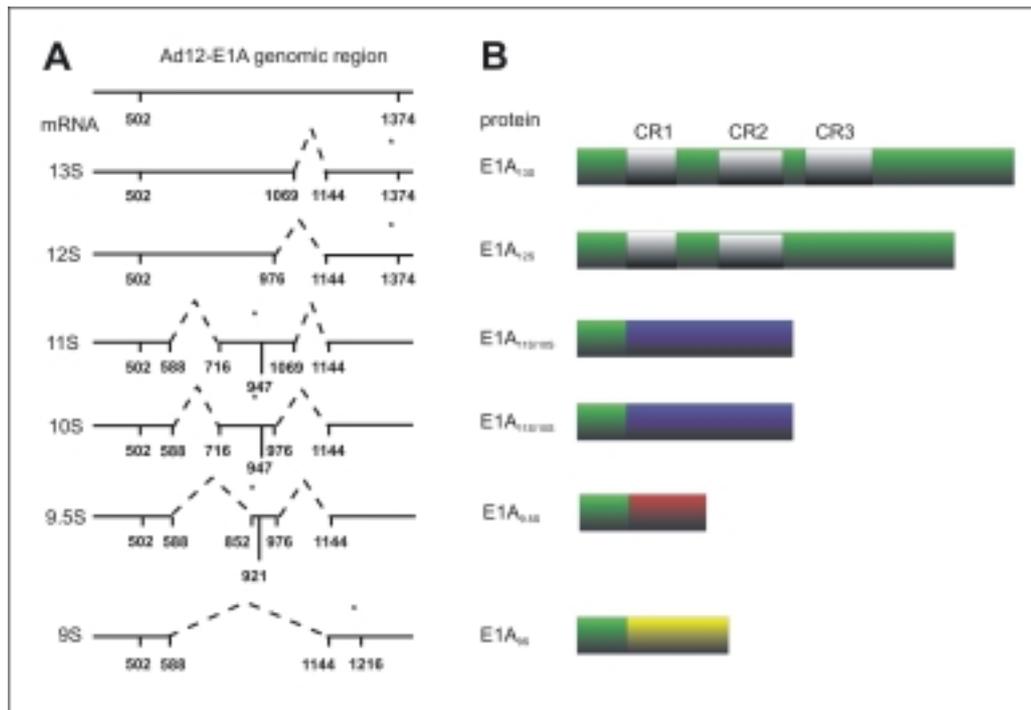
(z.B. Nagetierzellen) durch humanpathogene Adenoviren infiziert, verlaufen die frühen Schritte der Virusinfektion, die Adsorption und der Eintritt des Virus in die Wirtszelle, der Transport der viralen DNA in den Zellkern und die Expression der frühen Gene wie im produktiven Entwicklungszyklus. Durch eine Störung der viralen DNA-Replikation und/oder der Expression der späten viralen Gene – vermutlich aufgrund des Fehlens spezifischer Faktoren in Nagerzellen – kommt es zu keiner Bildung von infektiösen Viruspartikeln (Esche et al., 1979; Esche und Siegmann, 1982); die meisten Zellen überleben die abortive Infektion.

Durch die konstitutive Expression der frühen E1A- und E1B-Genprodukte, die vor allem den Zellzyklus der Wirtszelle deregulieren und die Apoptose der infizierten Zellen blockieren – einhergehend mit einer partiellen Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom – kommt es bei  $1 \times 10^{-5}$  bis  $1 \times 10^{-6}$  Zellen zur Transformation der infizierten Zelle (van der Eb und Bernards, 1984). *In vitro* sind dabei alle humanpathogenen Adenovirus-Serotypen dazu fähig, primäre nicht-permissive Nagetierzellen zu transformieren. Bei Injektion dieser Adenovirus-transformierten Zellen in immundefiziente Nager (z.B. „Nacktmäuse“) können diese Zellen zu Tumoren auswachsen. In immunkompetenten, syngen Mäusen gelingt die Induktion des Tumorwachstums jedoch nur, wenn die Zellen durch einen onkogenen Adenovirus-Serotypen transformiert wurden (als Übersicht s. Williams et al., 1995). Deswegen werden die unterschiedlichen Adenovirus-Serotypen bezüglich ihrer Onkogenität in immunkompetenten Nagern in nicht-onkogene (z.B. Ad5 und Ad2) und onkogene (wie z.B. Ad12 oder Ad31) Serotypen unterteilt, wobei die onkogenen Serotypen nochmals in hoch-onkogen (z.B. Ad12 und Ad31) und schwach-onkogen (wie Ad3 und Ad7) unterschieden werden. Diese Einteilung erfolgt in Abhängigkeit von dem Zeitraum der Tumorbildung nach Infektion und der Häufigkeit des Auswachsens dieser Zellen zu Tumoren (Wadell, 1984). Für die

Transformation der nicht-permissiven Zellen sind die Funktionen der Genprodukte der E1A- und der E1B-Region verantwortlich (van der Eb et al., 1977; van der Eb und Bernards, 1984). Wie in unterschiedlichen Studien gezeigt werden konnte, wird das onkogene Potenzial der Adenoviren durch die Herkunft der E1A-Region determiniert (Bernards et al., 1983). Das weist darauf hin, dass funktionelle Unterschiede der jeweiligen E1A-Region der verschiedenen Adenovirus-Serotypen die unterschiedliche Tumorigenität bewirken.

#### **1.4 Die E1A-Region des onkogenen Serotyps Ad12**

Die E1A-Region des onkogenen Serotypen Ad12 befindet sich am linken Ende des Adenovirus-Genoms („map units“ 1,3-4,5; Abb. 3) und kodiert für sechs unterschiedlich gespleißte mRNAs, die durch alternatives Spleißen aus der hnRNA der E1A-Region gebildet werden; entsprechend ihres Sedimentationskoeffizienten werden sie als 13S-, 12S-, 11S-, 10S-, 9,5S- und 9S-mRNA bezeichnet. Bei allen sechs genannten mRNAs sind die 5'- und 3'-Termini identisch. Aufgrund der Prozessierung der Vorläufer-RNA, bei der unterschiedlich große Introns eliminiert werden, differieren die Größen dieser mRNAs. Die sechs mRNAs kodieren für fünf Proteine: E1A<sub>13S</sub>, E1A<sub>12S</sub>, E1A<sub>10S/11S</sub>, E1A<sub>9,5S</sub> und E1A<sub>9S</sub> (Brockmann et al., 1990). E1A<sub>13S</sub> und E1A<sub>12S</sub> sind die beiden hauptsächlichen Genprodukte. Sie werden im gleichen Leseraster translatiert. Der Unterschied zwischen beiden besteht in dem Fehlen einer internen Region innerhalb des E1A<sub>12S</sub>-Proteins (Brockmann und Esche, 1995), die aus 31 Aminosäuren (nt 976 bis nt 1069) gebildet wird.



**Abb. 3 Struktur der mRNAs (A) und der davon abgeleiteten Proteine (B) der Region E1A des hochonkogenen Adenovirus Typ 12.** Die Zahlen unter den Linien in Abb. 3A geben die Position der Nukleotide im adenoviralen Genom an. Sie bezeichnen die Lage des gemeinsamen Startkodons, der Spleißstellen und des Stopkodons. Die grauen Regionen in Abb. 3B stellen Proteindomänen dar, die zwischen Ad12 und anderen Adenovirus-Serotypen in ihrer Aminosäuresequenz hoch konserviert sind (CR1-CR3). Die verschieden farbigen Bereiche der E1A-Proteine weisen auf unterschiedlich genutzte Leserahmen hin, die bei der Synthese der Ad12 E1A-Proteine genutzt wurden. (S) Svedberg-Einheit (nach Brockmann und Esche, 1995).

Dieser Bereich umfasst die konservierte Region 3 und repräsentiert eine der drei E1A-Regionen, die zwischen den verschiedenen Adenovirus-Serotypen hoch konserviert sind (CR1, CR2, CR3; Kimelmann et al., 1985). Diese konservierten Regionen exprimieren, neben dem nicht-konservierten Aminoterminus, die meisten transkriptionsregulierenden Funktionen. Bei den 11S-, 10S-, 9,5S- und 9S-mRNAs wird durch Spleißvorgänge eine Verschiebung des Leserahmens nach Aminosäure 29

hervorgerufen. Das führt dazu, dass die translatierten Proteine keine der konservierten Regionen enthalten und somit außer im N-terminalen Bereich keine Sequenzhomologien zu den Proteinen E1A<sub>13S</sub> und E1A<sub>12S</sub> aufweisen (Brockmann und Esche, 1995). Bis heute sind die funktionellen Aktivitäten dieser Proteine im lytischen Entwicklungszyklus noch weitgehend unerforscht.

### ***1.5 Kontrolle der Genexpression durch E1A-Proteine***

Die E1A-Proteine sind als Transkriptionsfaktoren für die Aktivierung der Expression aller anderen adenoviralen Gene notwendig (Berk, 1986). Nicht nur die Aktivierung der viralen Gene gehört zur Aufgabe der E1A-Proteine, sondern auch die negative (z.B. Insulin, Fibronectin oder Kollagen) und positive (z.B. hsp70, PCNA oder c-jun) Modulation der Expression zellulärer Gene (Brockmann und Esche, 1995). Da die E1A-Proteine keine eigene sequenzspezifische DNA-Bindeaktivität besitzen (Ferguson et al., 1985), werden die genregulatorischen Funktionen über Protein-Protein-Interaktionen mit spezifischen zellulären Faktoren ausgeübt. Diese zellulären Faktoren werden in vier Klassen unterteilt. In Abb. 4 sind einige der momentan bekannten Faktoren dargestellt.

#### ***(1) Generelle Transkriptionsfaktoren***

Die E1A-Proteine sind in der Lage, die virale Genexpression in der infizierten Zelle durch eine direkte Interaktion mit generellen Transkriptionsfaktoren effizient zu regulieren. Z.B. konnten die Interaktionen des E1A-Proteins mit den Komponenten des TFIID-Komplexes, mit TBP und TAF's, über die Zinkfinger-Transaktivierungsdomäne CR3 belegt werden (Brockmann und Esche, 1995). Außerdem wurde die Interaktion des E1A<sub>12S</sub>-Proteins mit der RAP30-Untereinheit des generellen Transkriptionsfaktors TFIIF über den N-Terminus (As 1-29) gezeigt

(Lipinski et al., 1998). Derartige Interaktionen führen unter anderem zu einer möglichen Stabilisierung von PICs (pre-initiation complex) an den Zielpromotoren (Brockmann et al., 2001).

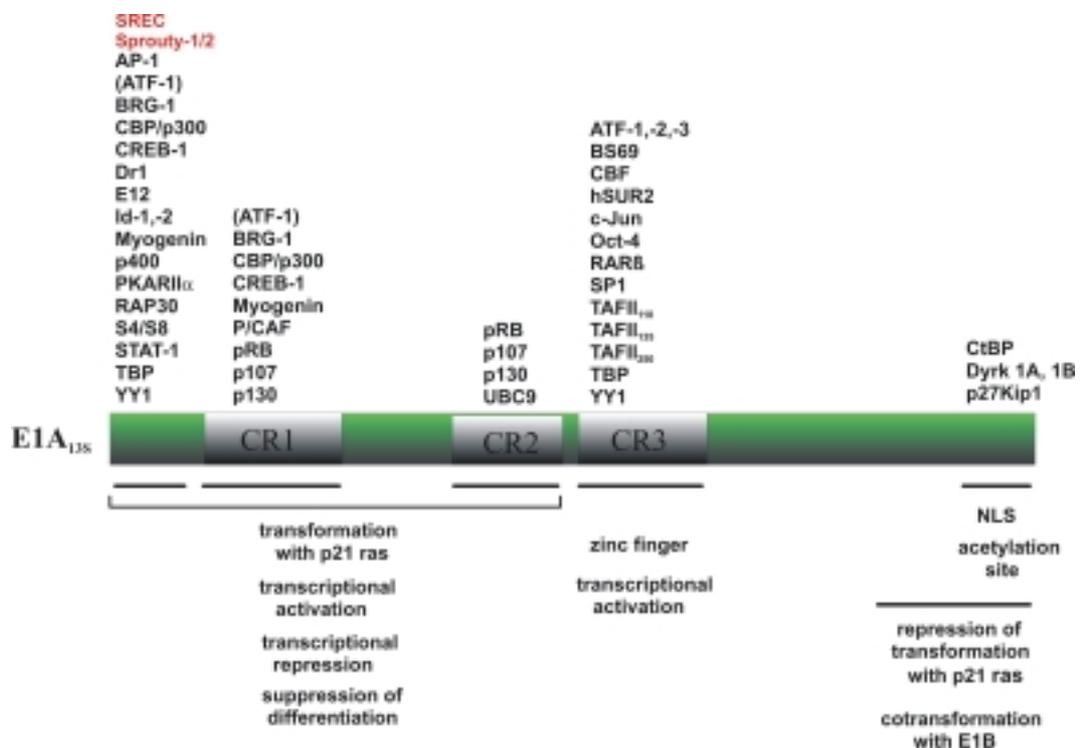
(2) *Sequenzspezifisch-bindende Transkriptionsfaktoren*

Die E1A-Proteine werden durch ihre Interaktion mit sequenzspezifisch an DNA-bindende Transkriptionsfaktoren an die entsprechenden Zielpromotoren rekrutiert (Liu und Green, 1990), was meistens zur Aktivierung der Expression des Zielgens führt (siehe Abb. 4). Die Aktivierung des c-jun-Promotors wird z. B. durch die Bindung der CR3-Domäne des E1A<sub>13S</sub>-Proteins an die zellulären Transkriptionsfaktoren c-Jun und ATF-2 ausgelöst (Duxndam et al., 1996). Im Aktivierungsprozess des adenoviralen E2-Promotors ist dagegen die Interaktion des N-terminalen Bereiches des E1A<sub>12S</sub>-Proteins mit den Transkriptionsfaktoren CREB-1 und ATF-1 essenziell (Fax et al., 2000).

(3) *Repressoren von DNA-sequenzspezifisch-bindenden Transkriptionsfaktoren*

Zu den zellulären Repressorproteinen, mit denen E1A-Proteine interagieren, gehören z.B. Dr1/DRAP1, p130, p107 und p105RB. Diese Proteine inhibieren die Aktivität von generellen bzw. sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren. Der Dr1/DRAP1-Komplex inhibiert die Interaktion von TBP (TATA-Box bindendes Protein) mit den generellen Transkriptionsfaktoren TF11A und TF11B, indem er selbst mit TBP in Interaktion tritt (Mermelstein et al., 1996). Durch die Interaktion mit den E1A-Proteinen dissoziiert der DR1/DRAP1-Komplex, was wiederum die Freisetzung von TBP auslöst und schließlich zur Initiation der Transkription führt. Die Repressoren p130, p107 und p105RB, die als sog. „pocket Proteine“ bezeichnet werden, interagieren mit den Mitgliedern der E2F-Transkriptionsfaktor-Familie (E2F-1-5), was zu einem transkriptionell inaktiven E2F/Pocket-Protein-Komplex am Promotor

und damit zu einer Repression der Transkription führt (Weintraub et al., 1992). Die Interaktion der E1A-Proteine mit den Pocket-Proteinen bewirkt die Freisetzung der transkriptionsaktiven E2F-Proteine aus dem inhibitorischen Komplex mit p105RB (Ikeda und Nevins, 1993), was wiederum die Aktivierung zahlreicher, für das Durchlaufen der S-Phase notwendiger Zielgene auslöst (Zhang und Dean, 2001). Für die Interaktion der E1A-Proteine mit den Pocket-Proteinen sind CR1/CR2 notwendig.



**Abb. 4: Zelluläre Proteine, mit denen das Ad12 E1A<sub>13S</sub>-Protein physikalisch und funktionell interagieren kann.** Der untere Teil der Abbildung zeigt Funktionen spezifischer E1A-Proteinregionen/-domänen, die aufgrund von Mutationsanalysen bestimmt wurden.

(4) *Zelluläre Koaktivatoren*

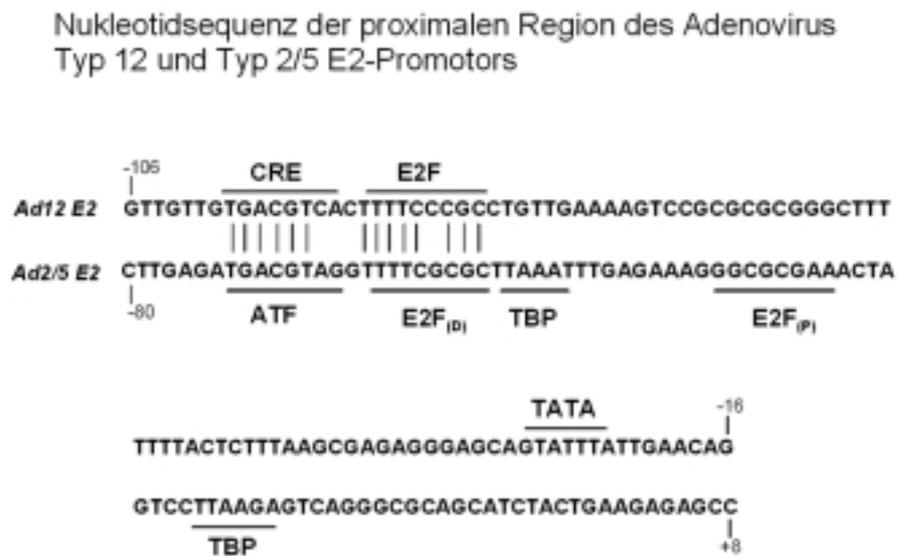
Zelluläre Koaktivatoren, zu denen auch CBP/p300 und PCAF gehören, sind wichtige Bindeglieder zwischen den sequenzspezifisch-bindenden Transkriptionsfaktoren und den Faktoren des basalen Transkriptionsapparates (Janknecht und Hunter, 1996). Die Transkription der Zielgene kann durch die Interaktion von E1A-Proteinen mit den Koaktivatoren sowohl positiv, als auch negativ moduliert werden. Die transkriptionelle Repression des Zielgens wird durch die Interaktion des N-Terminus und der CR1-Domäne der E1A-Proteine mit CBP/p300 bewirkt, was zu einer Dissoziation dieser Kofaktoren von dem Promotor-assoziierten Transkriptionsfaktorkomplex führt. Durch diesen Mechanismus wird auch die Transkription p53-abhängiger Zielgene unterdrückt (Lill et al., 1997; Gu et al., 1997). Ein weiterer Weg zur transkriptionellen Repression durch E1A-Proteine liegt in dem Konkurrieren um die Bindung an CBP/p300 mit dem CBP/p300-assoziierten Faktor PCAF. Dieser Mechanismus wird für die Inhibition der Transkription von PCAF-abhängigen Genen genutzt (Reid et al., 1998). Die Aktivierung der Transkription des Zielgens erfolgt durch Rekrutierung von Kofaktoren, wie z.B. von CBP/p300 an den Promotor-gebundenen Transkriptionsfaktorkomplex, durch die E1A-Proteine. Dieser Mechanismus wurde z.B. bei der Aktivierung von E2F-abhängigen Promotoren belegt, wobei diese Aktivierung jedoch unabhängig von der Freisetzung des E2F-Proteins aus dem inhibitorischen E2F/p105RB-Proteinkomplex durch die E1A-Proteine verläuft (Trouche und Kouzarides, 1996). Außerdem sind die E1A-Proteine in der Lage, die Transkription von PKA/CREB-abhängigen Promotoren zu aktivieren, wie z.B. den E2-Promotor des Adenovirus Serotyp 12 (s. Kapitel 1.6; Fax et al., 2000) oder den humanen PCNA-Promotor (proliferating cell nuclear antigen; Lee and Mathews, 1997).

An der Kontrolle der Expression zahlreicher induzierbarer Gene sind Kofaktoren beteiligt. Experimente verdeutlichen die Bedeutung der Kofaktoren bei der Regulation der Genexpression. Sie zeigen, dass eine Veränderung der basalen Transkription erst unter der Mitwirkung dieser Kofaktoren zu erreichen ist. Die Entdeckung einer Reihe enzymatischer Aktivitäten, die auch Änderungen in der Chromatinstruktur bewirken (Strahl und Allis, 2000), ergänzte die Kenntnisse über die Funktion der Koaktivatoren als wichtige Bindeglieder zwischen sequenzspezifisch-bindenden Transkriptionsfaktoren und Komponenten des basalen Transkriptionsapparates agieren zu können (Yuan et al., 1996). Diese Entdeckungen belegen und verdeutlichen nicht nur die entscheidende Rolle der Kofaktoren als Chromatin-remodellierende Proteine, sondern auch die zentrale Stellung des Chromatins bei der Genregulation. Die Interaktion der E1A-Proteine mit Chromatin-remodellierenden Faktoren ist für die Aktivierung der Expression der adenoviralen Gene und für die Modulation der zellulären Regulationsabläufe von besonderer Bedeutung, da nicht nur virale, sondern auch zelluläre DNA im Zellkern als Chromatin organisiert vorliegt.

### ***1.6 Der E2-Promotor des Adenovirus Serotyp 12***

Der E2<sub>Ad12</sub>-Promotor reguliert die Expression viraler Gene, deren Produkte für die Replikation der viralen DNA im produktiven Entwicklungszyklus benötigt werden. Bereits 1994 hat Sprengel die Nukleotidsequenz dieser Promotorregion beschrieben. Genauere Untersuchungen hinsichtlich der Regulationsmechanismen des E2<sub>Ad12</sub>-Promotors führte Dr. Peter Fax im Rahmen seiner Dissertation durch (Peter Fax, 2000). Er zeigte, dass folgende Transkriptionsfaktorbindestellen zwischen dem E2-Promotor des Serotyps Ad12 und Ad2/Ad5 konserviert sind: (1) das cAMP-Response-Element (E2-CRE genannt)

befindet sich relativ zum +1 definierten Transkriptionsstart bei nt -99 bis -92, (2) das E2F-Element (E2-E2F genannt) bei nt -89 bis -82 und (3) die TATA-Box bei nt -29 bis -24. Im Vergleich zum Ad2/5 E2-Promotor fehlt dem E2<sub>Ad12</sub>-Promotor die proximale E2F-Konsensussequenz und die TATA-Box (TBP-26) des minimalen Ad2/5 E2-Promotors (siehe Abb. 5). In seiner Arbeit zeigte Dr. Peter Fax, dass die E2-CRE-Sequenz und die TATA-Box die entscheidenden Promotorelemente zur Aktivierung des E2<sub>Ad12</sub>-Promotors darstellen.



**Abb.5:** Nukleotidsequenz der proximalen Promotorregion E2 der Adenoviren 12 und 2/5. Unterstrichen sind die Nukleotidsequenzen des cAMP response element (CRE), der Binderegion der E2F- und ATF-Transkriptionsfaktoren und die des TATA-Box-bindenden Proteins (TBP).

Für die Aktivierung des E2<sub>Ad12</sub>-Promotors durch das E1A<sub>12S</sub>-Protein sind sowohl die N-terminale Transaktivierungsdomäne, als auch die CR1-Domäne essenziell. *In vitro*-Analysen haben gezeigt, dass das E2-CRE-Promotorelement von CREB-1/ATF-1- oder c-Jun/ATF-2-beihaltenden Transkriptionsfaktorkomplexen gebunden wird. Weiterhin konnte er zeigen, dass das E1A<sub>12S</sub>-Protein den E2<sub>Ad12</sub>-Promotor über die cAMP/PKA-abhängigen Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1 und nicht über die c-Jun/ATF-2-beihaltenden Transkriptionsfaktorkomplexe aktiviert. Für das transaktivierende Potenzial der Transkriptionsfaktoren CREB-1 und ATF-1 ist am E2-Promotor die Rekrutierung der Koaktivatoren p300/CBP und des E1A-Proteins entscheidend (als Übersicht s. Montminy, 1997). Über den N-Terminus und die CR1-Domäne interagiert das E1A<sub>12S</sub>-Protein mit p300/CBP (Lipinski et al., 1999). Die Daten von Dr. Peter Fax weisen darauf hin, dass CBP entweder den CREB-1/E1A-Komplex stabilisiert oder zusätzliches E1A<sub>12S</sub>-Protein an den E2-CRE-gebundenen Aktivorkomplex rekrutiert. Sie bestätigten auch, dass Acetylierungsprozesse eine entscheidende Rolle in der E1A<sub>12S</sub>-vermittelten Aktivierung des E2<sub>Ad12</sub>-Promotors spielen. Die Acetyltransferaseaktivität von p300/CBP ist unabdingbar für den Aktivierungsprozess des E2<sub>Ad12</sub>-Promotors. Das E1A<sub>12S</sub>-Protein beeinflusst die HAT-Aktivität von CBP konzentrationsabhängig durch eine direkte Interaktion.

Da gezeigt werden konnte, dass der PKA-spezifische Inhibitor PKI die E1A<sub>12S</sub>-vermittelte Aktivierung des E2<sub>Ad12</sub>-Promotors reprimiert, muss angenommen werden, dass neben den Funktionen des E1A-Proteins auch Funktionen der PKA an der Aktivierung des E2-Promotors beteiligt sind.

### 1.7 *Der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg*

Zelluläre Signaltransduktionswege sind essenziell für die Physiologie einer Zelle und eine wichtige Voraussetzung für eine koordinierte Genexpression und die Anpassung von Zellen auf Signale in ihrer Umgebung. Durch zelluläre Signale wird das Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren an den Promotoren der Zielgene, z.B. durch Affinitätsänderungen der Faktoren an der DNA und anderer zellulärer Faktoren, beeinflusst.

Ein typisches Beispiel einer signalregulierten Genexpression ist der cAMP/PKA-abhängige Signalweg. Im inaktiven Zustand, also bei Abwesenheit des sekundären Botenstoffes cAMP, besteht der tetramere Komplex der Proteinkinase A (PKA) aus zwei regulatorischen (R) und zwei katalytischen (C) Untereinheiten. Durch einen cAMP-Anstieg im Zytoplasma, hervorgerufen durch die Aktivierung der Adenylatcyclase durch Konformationsänderung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, können zwei cAMP-Moleküle an jeweils eine regulatorische Untereinheit des PKA-Holoenzym binden. Diese Bindung führt zur Freisetzung der aktiven, monomeren C-Untereinheiten, die nun spezifische Substratproteine im Zellkern oder Zytoplasma phosphorylieren können.

Der zelluläre Transkriptionsfaktor CREB bindet an das cAMP-Response-Element (CRE) in Promotoren cAMP/PKA-induzierbarer Gene. Durch die translozierte C $\alpha$ -Untereinheit der PKA wird CREB im Zellkern an Serin-133 phosphoryliert (Hagiwara et al., 1993). Für die Aktivierung cAMP/PKA-abhängiger Promotoren sind auch die Koaktivatoren p300/CBP aufgrund ihrer Interaktionsdomänen, u.a. mit CREB, und ihrer intrinsischen Histonacetyltransferase-Aktivität essenziell (Korzus et al., 1998). Erst die Phosphorylierung an Serin-133 ermöglicht es CREB, die zellulären Koaktivatoren p300/CBP zu rekrutieren (zu binden). Außerdem wird durch die Phosphorylierung des N- und C-Terminus von CBP, durch die C-Untereinheit der PKA, die Koaktivatorfunktion

von CBP verstärkt (Hu et al., 1999). Für die Aktivierung CREB-abhängiger Zielgene sind diese Phosphorylierungen von CREB und p300/CBP essenziell.

### ***1.7.1 Regulation des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges durch die E1A-Proteine***

Im viralen Replikationszyklus ist die Modulation des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges durch die E1A-Proteine essenziell für die Expression spezifischer zellulärer und viraler Gene. Hierbei sind die E1A-Proteine in der Lage, die cAMP/CRE-abhängige Genexpression sowohl zu aktivieren, als auch zu reprimieren. Die Repression scheint durch die Dissoziation der Koaktivatoren p300/CBP von dem Transkriptionsfaktor CREB durch die Interaktion von E1A hervorgerufen zu werden, was vermutlich die Expression CREB-abhängiger Promotoren durch das E1A-Protein inhibiert. Gezeigt wurde dieser Mechanismus für zelluläre Promotoren wie den Somatostatin-Promotor oder den Interleukin-6-Promotor (Arany et al., 1995; Lundblad et al., 1995). Die Aktivierung des humanen PCNA („proliferating cell nuclear antigen“-)Promotors durch E1A erfolgt über ein CRE-Promotorelement, das von den cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktoren CREB und ATF-1 gebunden wird (Lee und Mathews, 1997). Einige Arbeiten belegen, dass die Aktivierung über das CRE-Promotorelement durch das E1A<sub>13s</sub>-Protein unabhängig von einer Behandlung mit cAMP-Analoga verläuft, z.B. bei der Aktivierung adenoviraler Promotoren in Rattenzellen (PC12; Sassone-Corsi, 1988) oder der Aktivierung des zellulären c-fos-Promotors in Affenzellen (CV-1; Tan et al., 1989). Dagegen zeigen andere Studien, dass eine Aktivierung nur in Gegenwart von cAMP oder cAMP-Analoga stattfinden kann (Gedrich und Engel, 1995).

Ebenso wie der E2<sub>Ad12</sub>-Promotor (Fax et al., 2000) enthalten die meisten adenoviralen Promotoren CRE-Elemente, deren Regulation im lytischen

Entwicklungszyklus neben den E1A-Proteinen über den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg erfolgt. Die Regulation der, ein CRE-Element enthaltenden, viralen Promotoren sowohl durch E1A-Proteine, als auch durch den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg, ließ vermuten, dass sich möglicherweise beide Komponenten gegenseitig beeinflussen.

Daten der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass das E1A<sub>12S</sub>-Protein mit der R1 $\alpha$ - und der R11 $\alpha$ -Untereinheit *in vitro* und *in vivo* interagiert. Die Bindung des E1A<sub>12S</sub>-Proteins an die regulatorische Untereinheit RII $\alpha$  führt zu einer spezifischen Translokation der zytoplasmatisch-lokalisierten R11 $\alpha$ -Untereinheit in den Zellkern. Dort scheint sie, durch die E1A-Proteine an den E2<sub>Ad12</sub>-Promotor rekrutiert, ihrerseits die katalytische Untereinheit C $\alpha$  der PKA an den Promotor zu rekrutieren. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass es sich dabei um einen bisher unbekanntem Mechanismus der E1A<sub>12S</sub>-vermittelten Aktivierung von CRE/CREB-abhängigen Zielgenen handelt.

Durch transiente Expressionsanalysen wissen wir heute, dass es im Zuge der cAMP-unabhängigen Aktivierung des E2<sub>Ad12</sub>-Promotors zur Bildung eines ternären Komplexes kommt, der aus den cAMP/PKA-abhängigen Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1, den Koaktivatoren p300/CBP und dem E1A<sub>12S</sub>-Protein besteht. Dabei aktiviert das E1A-Protein die Acetylase-Aktivität des Koaktivators p300/CBP, der wiederum die aminoterminalen Enden der nukleosomalen Histone acetyliert. Die Acetylierung der Histonden der Nukleosomen scheint eine Voraussetzung für die Aktivierung des E2-Promotors und für die Rekrutierung weiterer Proteinkomplexe zu sein, die zusätzlich an der Aktivierung des E2-Promotors beteiligt sind. Ein solcher Proteinkomplex ist der Chromatin-remodellierende Komplex SWI/SNF.

### **1.8 Chromatinstruktur und Regulation der Genexpression**

Das genetische Material eukaryontischer Zellen ist derart strukturiert, dass es als kompakte Masse in einem abgegrenzten Zellbereich vorliegt. Als fadenförmige Struktur betrachtet, wäre die DNA weitaus länger, als es die sie umgebende Hülle zulässt. Die menschliche DNA ist 1,80m lang und muss in einen Zellkern von ca. 6µm Durchmesser passen. Diese dichte Verpackung der DNA ist jedoch nicht statisch, sondern unterliegt im Laufe des Zellzyklus einigen Modifikationen. Diese kompakte Verpackungsform der mit Histonproteinen assoziierten DNA bezeichnet man bei Eukaryonten als Chromatin. Histonproteine sind kleine basische Proteine von 11 bis 21kDa, bei denen ca. 25% der Proteinmasse auf die Aminosäuren Arginin und Lysin entfällt. Das Histon-Motiv, das sich im globulären C-terminalen Ende der Proteine befindet, ist für die Wechselwirkung der Histone untereinander bzw. mit der DNA verantwortlich. Die Grundverpackungseinheit des Chromatins, das Nukleosom, ist bei allen Eukaryonten gleich gestaltet und besteht aus ca. 150bp DNA, die sich schraubenförmig um einen stabilen octameren Kern aus Histonproteinen windet („perlenähnliche Struktur“). Das Histon-Octamer wird aus zwei H2A und H2B Dimeren und einem H3/H4 Heterotetramer (Kornberg und Lorch, 1999) gebildet. Eine derart kompakte Verpackungsform des Chromatins kann nur über eine mehrere Stufen beinhaltende Organisationsform erreicht werden. Die in regelmäßigen Abständen auftretenden internukleosomalen DNA-Bereiche sind mit H1-Histonen (Linker-Histonen) assoziiert (Wolffe, 1995). Durch die Assoziation mit Linker-Histonen und einer Reihe von nicht-Histonproteinen, wie z.B. HMG-Proteine (high-mobility group), wird die „Perlenstruktur“ spiralförmig angeordnet, was zu einer kompakteren Verpackung in Form der 30nm Chromatinfibrille (Grunstein, 1998) führt, was der zweiten Organisationsstufe entspricht. Die dritte und endgültige Organisationsebene wird durch die Anordnung der

Chromatinfibrille in schleifenförmigen Strukturen, die über ein Proteingerüst (scaffold) mit der Kernmatrix verbunden sind, erreicht. Bis jetzt ist der molekulare Aufbau und die Struktur der Chromatinfibrille und ihrer höheren Verpackungsordnungen nicht genau aufgeklärt worden. In der hoch-organisierten, kompakten Form des Chromatins wird die Transkription inhibiert, was sowohl auf der nukleosomalen Anordnung, als auch auf der höheren Verpackungsordnung in der Chromatinfibrille beruht (Peterson, 2000). Die Interaktion von Histonproteinen mit der DNA führt zur Blockierung von DNA-Regionen im Promotor, die für die Regulation essenziell sind. Dies verhindert, dass die sequenzspezifisch DNA-bindenden Proteine mit dem entsprechenden DNA-Bereich des Promotors interagieren können. Eine zusätzliche Barriere bilden die Nukleosom/Nukleosom-Interaktionen in den Chromatinfibrillen. Sämtliche im Transkriptionsprozess involvierten Proteine müssen zunächst diese Barrieren überwinden, was erst durch die Rekrutierung von Chromatin-remodellierenden Faktoren ermöglicht wird. Die Aktivität der Chromatin-remodellierenden Faktoren ist grundlegende Voraussetzung für die Interaktion regulatorischer Proteine bzw. der Proteine der basalen Transkriptionsmaschinerie mit ihren Zielsequenzen auf der DNA (Kingston und Narlikar, 1999). Die bis jetzt bekannten Chromatin-remodellierenden Faktoren werden in zwei Klassen unterteilt (Berger, 2002; Narkikar et al., 2002), abhängig davon, wie sie die Änderung der Chromatinstruktur herbeiführen. Die erste Klasse wird von den Faktoren gebildet, die unter dem Verbrauch von Energie die Änderung der Chromatinstruktur auslösen. Die zweite Klasse umfasst die Faktoren, die die Änderung durch kovalente Modifikationen an den N-terminalen Enden der Histoproteine, wie z.B. Acetylierung, Phosphorylierung oder Methylierung, herbeiführen. Von diesen kovalenten Modifikationen ist die Histonacetylierung der Mechanismus, der am besten erforscht und am häufigsten mit der Genaktivierung in Verbindung gebracht wird.

Die Chromatinstruktur ist essentiell für die Kontrolle der Gene. Sie bestimmt sowohl die Aktivierung, als auch die Abschaltung von Genen, was die Chromatinstruktur und die Chromatin-remodellierenden Faktoren zu einer zentralen Schlüsselfigur macht. Bereits die Abschaltung von drei unangemessenen Genen kann eine normale Zelle in eine Krebszelle verwandeln (Wolffe, 2001). Abweichende DNA-Methylierung der Promotor-Region stellt einen zentralen Mechanismus für die Inaktivierung von Genen dar, die für die Suppression der Tumorgenese zuständig sind. DNA-Methylierungs-Inhibitoren wie 5-Azadeoxycytidine (5AZA), aber auch Histon-Deacetylase (HDAC) - Inhibitoren stellen einen neuen Behandlungsansatz bei Krebs dar (Momparker, 2003).

### **1.9 Zielsetzung**

Zur Aktivierung der adenoviralen Promotoren während des lytischen Entwicklungszyklus sind die E1A-Proteine essenziell, da sie eine zentrale Rolle bei der Regulation der adenoviralen Genexpression spielen. Wie oben beschrieben, ist an der Regulation (Aktivierung) des E2<sub>Ad12</sub>-Promotors neben den E1A-Proteinen auch die Proteinkinase A (PKA) beteiligt. Letzte Hinweise aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Esche zeigen, dass an der Aktivierung des E2-Promotors zusätzlich Chromatin-remodellierende Komplexe, wie der SWI/SNF-Komplex beteiligt sind.

Alle bisherigen Experimente zur Regulation des E2-Promotors wurden durch transiente Expressionsanalysen nach Transfektion entsprechender Expressions- und Reporterkonstrukte durchgeführt. Transfizierte Vektor-DNA wird, nachdem sie in den Kern transportiert wurde, durch Bindung von Histonproteinen, in Chromatin-ähnliche Strukturen verpackt, die jedoch nur annähernd den Chromatinstrukturen des Wirtsgenoms entsprechen. Um nicht nur die Aktivierung der viralen sondern auch der zellulären

Promotoren, die über CREB und durch E1A reguliert werden, genauer studieren zu können, sollte ich humane Zelllinien etablieren, in denen der E2-Promotor kovalent in die Wirts-DNA integriert ist und in der gleichen Chromatinstruktur vorliegt, wie andere CREB-regulierte zelluläre Gene. Die essenzielle Bedeutung der Chromatinstruktur und der Chromatin-regulierenden Faktoren für die Tumorgenese und damit auch für die Krebstherapie ist inzwischen unbestritten, aber nach wie vor sind noch viele Mechanismen der Chromatin-Remodellierung unerforscht. Mit dieser Zelllinie, in der der E2-Promotor in der Chromatinstruktur vorliegen sollte, sollten einige dieser unbekanntenen Mechanismen erforscht werden. Hierzu sollte ich geeignete, den E2<sub>Ad12</sub>-Promotor enthaltende, Reporterkonstrukte und anschließend Zellklone herstellen, die das Reporterkonstrukt kovalent integriert im Zellgenom tragen.

Zur Generierung dieser Zelllinien gab es zwei wichtige Grundvoraussetzungen: (1) Um die Aktivierung des E2-Promotors analysieren zu können, sollten die Zelllinien ein leicht zu detektierendes Reporterprotein unter der Kontrolle des E2<sub>Ad12</sub>-Promotors exprimieren. (2) Der E2<sub>Ad12</sub>-Promotor des kovalent ins Wirtsgenom integrierten Reporterkonstrukts sollte durch die bisher bekannten viralen und zellulären Aktivatoren gut regulierbar sein.

## 2. Material

Hier nicht aufgeführte Chemikalien (mindestens mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“) und nicht erwähnter allgemeiner Laborbedarf wurden von variablen Herstellern bezogen.

### 2.1 Chemikalien

Acrylamid	Bio-Rad, München
Agarose	FMC, über Biozym, Hameln
Ampicillin (Binotal)	Bayer, Leverkusen
Bacto Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto Tryptone	Difco, Detroit, USA
Bacto Yeast Extract	Difco, Detroit, USA
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg
Desoxyribonukleotide	Boehringer, Mannheim
DMSO	Riedle-de Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Forskolin	Calbiochem, Bad Soden
Glycerin	Fluka, Deisenhofen

Glutaraldehyd	Sigma, Deisenhofen
Kaliumhexacyanoferrat (II)	Fluka, Deisenhofen
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Fluka, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Metafectin	Biontex, München
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
N,N-Methylen-bisacrylamid	Sigma, Deisenhofen
Polyfectin	Biontex, München
SDS	Bio-Rad, München
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tris	Sigma, Deisenhofen
X-Gal	Sigma, Deisenhofen

## 2.2 Enzyme

<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5U/μl)	Sigma, Deisenhofen
Trypsin (Rinderpankreas, 110U/μl)	Boehringer, Mannheim
Restriktionsenzyme (10-50U/μl)	Boehringer, Mannheim Gibco BRL, Eggenborff

**2.3 Antikörper**

Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Peroxidase-Konjugat)	Amersham, Freiburg
Anti-Phospho-CREB	Upstate Biotechnology, Biomol, Hamburg
Anti-PKA- $\alpha$ cat (c-20) (polyklonaler Kaninchen IgG-AK)	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA

**2.4 Kits**

$\beta$ -Gal Assay Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande
$\beta$ -Gal Staining Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Maxi-Präp Plasmid Kit Nucleobond AX 500	Macherey & Nagel, Düren
pBlue-TOPO Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

**2.5 Molekulargewichtsstandards**

1Kb Plus DNA Ladder	Gibco BRL, Eggenstein
Kaleidoscope Prestained Standards	Bio Rad, München

**2.6 Lösungen und Materialien für die Zellkultur**

100x Nicht-Essentielle Aminosäuren	Gibco BRL, Eggenstein
DME	Gibco BRL, Eggenstein
Fetales Kälberserum	Gibco BRL, Eggenstein
G418	Sigma, Deisenhofen
Kryoröhrchen	Greiner GmbH, Frickenhausen
L-Glutamin	Merck, Darmstadt
Penicillin G (1000U/ml)	Hoechst, Frankfurt
Puromycin	Sigma, Deisenhofen
Streptomycinsulfat (120µg/ml)	Sigma, Deisenhofen
6-Well und 24-Well Zellkulturplatten	Greiner GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen (25cm <sup>2</sup> , 75cm <sup>2</sup> )	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Gewebekulturschalen (φ 10cm oder φ 14.5cm)	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg Greiner GmbH, Frickenhausen

**2.7 Besondere Verbrauchsmaterialien**

Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Farbfilm AGFA HDC plus	Agfa- Gevaert AG, Leverkusen
Hybond C extra, Nitrozellulose-Membran	Amersham, Freiburg
Hybond N extra, Nylon-Membran	Amersham, Freiburg
Röntgenfilm X-omat AR	Kodak, Rochester, USA

Whatman Filterpapier	Whatman, Maidstone, UK
----------------------	------------------------

### 2.8 Spezielle Geräte

DNA Trio Thermoblock für PCR	Biometra, München
Automatic TLC- Linear Analyzer	Berthold, Overath
Gene Pulser Elektroporator	Bio-Rad, München

### 2.9 Puffer und Lösungen

Acrylamid-Lösung	29,2g Acrylamid 0,8g N, N- Bisacrylamid mit A. bidest auf 100ml
Ampicillin- Lösung	50mg/ml in A. bidest
APS- Lösung (10%)	0,1g/ml in A. bidest
5x DNA- Probenpuffer	150mM EDTA 25 (v/v) Glycerin 0,05% (w/v) Bromphenolblau
dNTP- Mix (PCR)	1,25mM dATP 1,25mM dCTP 1,25mM dGTP 1,25mM dTTP in A. bidest (Lagerung bei $-20^{\circ}$ C)
Ethidiumbromid- Lösung	10mg/ml in A. bidest
Gelentfärber	100ml Essigsäure 125ml Isopropanol auf 1000ml mit A. bidest

Gelfärber	450ml H <sub>2</sub> O 450ml Methanol 100ml Essigsäure 2,5g Coomassie Blue
Gelfixierer (Fluorographie)	250ml Methanol 35ml Essigsäure auf 500ml mit A. bidest
LB-Agar	15g Agar in 1000ml LB-Medium
LB-Agar/Ampicillin	LB-Agar mit 100µg/ml Ampicillin
LB-Medium	10g Tryptone 10g NaCl 5g Yeast Extract auf 1000ml mit A. bidest (Lagerung bei 4°C)
PBS	0,4mM MgSO <sub>4</sub> 0,7mM CaCl <sub>2</sub> 1,4mM H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 137mM NaCl 2,7mM KCl 6,5mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
PBS <sup>=</sup>	wie PBS, nur ohne MgSO <sub>4</sub> und CaCl <sub>2</sub>
Puromycin-Lösung	0,5µg/10ml in A. bidest.
SDS-PAGE-Laufpuffer (1x)	25mM Tris/HCl, pH8,3 250mM Glycerin 0,1% (w/v) SDS
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	0,5M Tris/HCl, pH8,8 0,4% (w/v) SDS
SDS-PAGE-Trenngelpuffer	1,5M Tris/HCl, pH8,8 0,4% (w/v) SDS
TAE-Puffer (50x)	2M Tris Base 1M Natriumacetat 100mM EDTA, pH7,4
TBS-Blockierungspuffer	1x TBS 0,1% (v/v) Tween 20 10% (w/v) Magermilchpulver

TBS-Puffer	10mM Tris/HCl, pH8,0 150mM NaCl
TBS/Tween 20	1x TBS 0,1% (v/v) Tween 20
Transferpuffer (für den Western Blot)	48mM Tris, pH7,5 39mM Glycin 0,037% (w/v) SDS 20% (v/v) Methanol
Trypsin-Lösung	0,5M EDTA 2g/l Trypsin

### 2.10 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> :	K 12 DH5 $\alpha$ ( <i>supE44</i> , $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> M15) <i>hsdR</i> 17 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> , <i>thi1</i> <i>relA1</i> ) (Gibco BRL, Eggenndorf)
TOP10 Cells:	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>deoR</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1</i> <i>nupG</i> (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

### 2.11 Zelllinien

COS7-Zellen	etablierte SV40 transformierte Nierenzelllinie der Grünen Meerkatze, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA (Gluzman, 1981)
HeLa <sup>tk-</sup>	etablierte humane epitheloide Cervix Karzinomlinie; American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA (Gey et al., 1952)
KB-Zellen	etablierte humane oral epidermoide Karzinomlinie; American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA (Eagle, 1955)

### 2.12 Plasmide

pBabe-Puro	Retrovirus-Expressionsvektor mit Puromycin als Resistenzgen (zur Verfügung gestellt von Dr. H. Land, Imperial Cancer Research Fund, London, UK)
E2-CAT	zur Verfügung gestellt von C. Svensson, Department of Medical Immunology & Microbiology, Uppsala University, Schweden
pBLCAT3	Luckow und Schütz, 1987
PRc/RSV	eukaryontischer Expressionsvektor, Invitrogen, San Diego, USA
pRc/RSV-E1A <sub>12S</sub>	exprimiert das E1A <sub>12S</sub> -Protein von Ad12
RSV-CHO-PKA-C $\alpha$	exprimiert die katalytische Untereinheit C $\alpha$ der PKA zur Verfügung gestellt von R.A. Maurer, Dept. Of Cell and Developmental Biology, School of Medizin, Oregon Health Science University, Portland, USA

### 2.13 Oligonukleotide

Die hier aufgeführten Oligonukleotide wurden von der MWG Biotech GmbH (Ebersberg) oder Metabion (Martinsried) synthetisiert, entsalzt und lyophilisiert. Zur Erstellung einer Stammlösung mit der Endkonzentration von jeweils 100pmol/ $\mu$ l wurden die Oligonukleotide in H<sub>2</sub>O aufgenommen. Modifikationen oder zusätzlich synthetisierte Nukleotide, wie z.B. Restriktionsschnittstellen in den aufgeführten Oligonukleotiden, sind in Klammern gesetzt.

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')
3' E2 <sub>Ad12</sub> , Ad12-Genom nt 25501	(CGGGATCC)CTTGCAGGACGCAGAAGCTC
5' E2 <sub>Ad12</sub> , Ad12-Genom nt 25641, (für E2 <sub>Ad12</sub> (140bp)-Promotor)	(CGGGATCC)GTAAGGCGTGGGAATATCTTT

pSP72 (Sequenzierungs-Primer für CAT-Vektoren)	GTTCTTTACGATGCCATTGG
5' E2 <sub>Ad12</sub> , Ad12-Genom nt 25589, ΔE2F (Deletion der E2-E2F-Sequenz im E2 <sub>Ad12</sub> (140bp)-Promotor)	(CGGGATCC)TGACGTCATGTTGAAAGTCGCGCGCGGCTTT
5' E2 <sub>Ad12</sub> , Ad12-Genom nt 25609, ΔCRE (Deletion des E2-CREs im E2 <sub>Ad12</sub> (140bp)-Promotor)	(CGGGATCC)CTTTTCCCGCCTGTTGAAA
5' E2 <sub>Ad12</sub> , Ad12-Genom nt 25641, pmCRE (Punktmutationen im E2-CRE des E2 <sub>Ad12</sub> (140bp)-Promotors)	(CGGGATCC)GTAAGGCGTGGGAATATCTTTACT TCATCTTGTTGTGAATTCAC <del>T</del> TTTCC
5' E2 <sub>Ad12</sub> , Ad12-Genom nt 25641, pmE2F (Punktmutationen der E2-E2F-Sequenz im E2 <sub>Ad12</sub> (140bp)-Promotor)	(CGGGATCC)CGTAAGGCGTGGGAATATCTTTAC TTCATCTTGTTGTGACGTCAC <del>T</del> TTTCCATACTGTT GAA
3' E2 <sub>Ad12</sub> , Ad12-Genom nt 25481, pmTATA (Punktmutationen in der TATA-Box des E2 <sub>Ad12</sub> (140bp)-Promotors)	(CGGGATCCT)GTTCAA <u>AAAAA</u> ACTGCTCCCTCTC
3' CMV	AATTCGATAAGCCAGTAAGCAGT
5' CMV	CGATGTACGGGCCAGATATACGCG

### **3. Methoden**

#### **3.1 *Allgemeines***

Sämtliche Arbeiten mit Bakterien und Säugetierzellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dabei verwendete Lösungen und Materialien wurden entweder autoklaviert (121°C, 1bar) oder sterilfiltriert.

Nicht einzeln aufgeführte molekularbiologische Arbeitsmethoden sind den Laborhandbüchern „Molecular Cloning: a laboratory manual, second edition“ (Sambrook et al., 1989) und „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel et al., 1997) entnommen.

#### **3.2 *Herstellung kompetenter Bakterien***

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde die modifizierte Methode nach Hanahan (1985) benutzt. 100ml einer frischen Übernachtskultur des *E. coli*-Stammes DH5 $\alpha$  wurde bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von max. 0,4 bei 37°C und 200 rpm in einem Schüttelinkubator vermehrt. Die Bakterien wurden nach zehnmütiger Abkühlung auf Eis abzentrifugiert (4°C, 4000 rpm, 10 Minuten), der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 40ml TFB-1 resuspendiert, 10 Minuten auf Eis inkubiert und erneut abzentrifugiert (4000 rpm, 4°C, 5 Minuten). Die Resuspension des Pellets erfolgte in 4ml eiskaltem TFB-2. Nach einer Inkubation von 60 Minuten auf Eis wurden die kompetenten Bakterien zu je 100 $\mu$ l aliquotiert, im Trockeneisbad schockgefroren und anschließend bei -70°C gelagert.

### 3.3 *Transformation kompetenter Bakterien*

Zur Transformation wurden 100µl kompetente *E. coli* in der Hand aufgetaut und anschließend mit 10-50ng Plasmid-DNA transformiert. Nach dem Hinzufügen der DNA wurden die Bakterien für 30 Minuten auf Eis inkubiert und für genau 90 Sekunden einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Anschließend erfolgte eine ein- bis zweiminütige Inkubation auf Eis. Der Transformationsansatz wurde auf Agarplatten (100µg/ml Ampicillin) zur Selektion transformierter Bakterien ausplattiert. Es erfolgte eine Inkubation der Agarplatten bei 37°C im Brutschrank für max. 20 Stunden. Von einzelnen Bakterienklonen wurden Bakterienstocks angelegt, wozu 750µl einer Übernachtskultur mit 250µl Glycerin gemischt und bei -70°C gelagert wurden.

### 3.4 *Isolierung von Nukleinsäuren*

#### 3.4.1 *Präparation von Plasmid-DNA*

Das Prinzip der Isolation von Plasmid-DNA basiert auf der Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979).

#### 3.4.2 *Plasmid-DNA Maxi-Präparation*

200ml LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin wurden mit plasmidhaltigen Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Übernachtskultur wurde bei 4000 rpm, 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA Maxipräparation

erfolgte mit Hilfe des Maxi-Präp Plasmid Kit Nucleobond AX 500 gemäß den Angaben der Herstellerfirma Macherey & Nagel. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde in 100µl A. bidest aufgenommen und die Konzentration photometrisch bei 260/280nm bestimmt, wobei eine optische Dichte von  $OD_{260} = 1$  einer Konzentration von 50µg/ml DNA entspricht (Sambrook et al., 1989).

#### *3.4.3 Plasmid-DNA Mini-Präparation*

1,5ml einer Übernachtskultur wurden 5 Minuten bei 6000 rpm bei 20°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 300µl S1-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 300µl S2-Puffer hinzugefügt und durch invertieren vermischt. Nach einer maximalen Inkubation von 5 Minuten bei RT wurde 300µl kalter S3-Puffer hinzugegeben, durch Schütteln vermischt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach fünfzehnminütiger Zentrifugation bei 4°C und 1400 rpm wurde der Überstand vollständig entfernt. 630µl Isopropanol wurden zugefügt und das Gemisch 20-30 Minuten bei RT bei 1400 rpm zentrifugiert. Danach erfolgte eine zweimalige Waschung mit jeweils 1ml ETOH (70%) und Zentrifugation für 10 Minuten bei RT bei 1400 rpm. Die DNA wurde bei RT getrocknet und in 20µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### *3.4.4 Präparation genomischer DNA aus Eukaryotenzellen*

$5 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$  Zellen wurden durch Passagieren geerntet, in PBS<sup>-</sup> aufgenommen und 5 Minuten bei 4°C und 10000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1ml PBS<sup>-</sup> resuspendiert

und erneut für 1 Minute bei 10000 rpm zentrifugiert. Die Präparation genomischer DNA aus Eukaryotenzellen erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit nach den Angaben der Herstellerfirma Qiagen. Die Elution der DNA erfolgte durch eine dreiminütige Inkubation mit 100µl H<sub>2</sub>O bei RT und abschließender Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 Minute. Die DNA wurde bei –20°C gelagert.

### **3.5 *Modifikation von DNA***

#### **3.5.1 *Restriktion von DNA mit Restriktionsenzymen***

Das Schneiden der DNA wurde nach den Angaben der Herstellerfirma der Restriktionsenzyme mit den bereitgestellten Puffern und der für das Enzym optimalen Temperatur (in der Regel 37°C) durchgeführt. Für die Restriktion von Plasmid-DNA wurden 1-2U Enzym pro µg DNA eingesetzt. Der Ansatz wurde für 2 Stunden inkubiert.

#### **3.5.2 *Ligation***

Die Ligation wurde mit dem pBlue-TOPO Cloning Kit gemäß den Angaben des Herstellers Invitrogen durchgeführt. Dabei wurde ein Verhältnis von Insert-DNA zu TOPO<sup>®</sup> Vector von 1:1 verwendet. Für den Reaktionsansatz aus PCR-Produkt, Salt Solution, sterilem Wasser und TOPO<sup>®</sup> Vector wurde als Inkubationszeit 5 Minuten bei RT gewählt. Nach Zugabe von 2µl des Ligationsansatzes pro Zellstock One Shot<sup>®</sup> Chemically Competent *E. coli*

betrug die gewählte Inkubationszeit 25 Minuten auf Eis. Die weiteren Schritte der Transformation erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers.

### **3.6 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese von DNA**

Durch die horizontale Agarose-Gelelektrophorese im TAE-Puffersystem kann eine Größenbestimmung und Konzentrationsabschätzung von DNA-Fragmenten durchgeführt werden. In Abhängigkeit von der Agarosekonzentration können dabei DNA-Fragmente zwischen 200bp und 25kbp elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Agarose wurde durch Erhitzen im TAE-Puffer gelöst. Die hergestellten Gele enthielten eine Agarosekonzentration von 1-2%. Zur späteren Detektion der DNA unter UV-Licht wurde der Agarose Ethidiumbromid-Lösung zugesetzt. Den zu analysierenden DNA-Lösungen wurde 1/5 des Endvolumens 5x Probenpuffer zugefügt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 2–5V/cm<sup>2</sup> durchgeführt.

### **3.7 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen**

Unter UV-Licht wurden die entsprechenden Banden der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit gemäß den Angaben des Herstellers. Die DNA wurde hierbei mit 30µl H<sub>2</sub>O eluiert und anschließend wurde ihre Konzentration photometrisch bestimmt.

### 3.8 *Amplifikation von DNA-Sequenzen*

#### 3.8.1 *PCR (Polymerase Kettenreaktion)*

Die PCR (Mullis et al., 1986) ist ein *in vitro* Verfahren zur selektiven Anreicherung von spezifischen Nukleinsäure-Sequenzen. Das Verfahren basiert darauf, dass DNA-Polymerasen in der Lage sind, Einzelstränge zu Doppelsträngen aufzupolymerisieren. Dafür verwendet man Primer (einzelsträngige Oligonukleotide), die komplementär zu den jeweiligen Randbereichen der zu amplifizierenden DNA-Matrize (template) sind. Durch Erhitzung wird der DNA-Doppelstrang zu Einzelsträngen denaturiert. Unter geeigneten Bedingungen kann nun die Hybridisierung zwischen jeweils einem Einzelstrang und dem ihm komplementären Primer erfolgen (Annealing). Das Hybridmolekül ist nur im Bereich der Primer doppelsträngig. Die DNA-Polymerase kann nun bei Anwesenheit von dNTPs die Einzelstränge zu Doppelsträngen aufsynthetisieren (Elongation), man erhält zwei neue, doppelsträngige DNA-Moleküle. Der zweite Reaktionszyklus beginnt mit einer erneuten Hitzedenaturierung, um wieder Einzelstränge als Matrizen zu erhalten. An diesen können mit Hilfe der DNA-Polymerase nach erneuter Hybridisierung mit den strangspezifischen Primern Doppelstränge entstehen. Als Reaktionsprodukt erhält man vier Doppelstränge. Nach jedem Reaktionszyklus bestehend aus den Reaktionsschritten DNA-Denaturierung, Annealing und Elongation erhält man eine Verdopplung der DNA, was zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung der durch die Primer flankierten DNA-Sequenz führt. Durch die Verwendung der hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) können alle Reaktionszyklen im gleichen Reaktionsansatz durchgeführt werden,

ohne der Notwendigkeit, nach jedem Denaturierungsschritt wieder neue DNA-Polymerase hinzufügen zu müssen.

Die verwendeten Primerpaare wurden danach ausgesucht, dass sie eine ähnliche Schmelztemperatur ( $T_M$ ) oberhalb von 50°C hatten. Durch die Temperaturabsenkung auf 37-65°C, nach der Denaturierungsphase bei 95°C, binden die Primer in Abhängigkeit von ihrer Schmelztemperatur an die denaturierte DNA (Annealing). Die Schmelztemperatur wurde nach der, vom Hersteller MWG Biotech angegebenen, Formel berechnet:  $T_M = 69,3^\circ\text{C} + 0,41 \times (\text{GC in Prozent}) - 650 / \text{Primerlänge}$ . Die Primer hatten in der Regel eine Länge von 20-30 Nukleotiden.

Die Methode der PCR wurde hauptsächlich zum Nachweis der Integration adenoviraler DNA-Sequenzen in das Genom von Eukaryontenzellen eingesetzt, wobei ein typischer PCR-Ansatz wie folgt aussah:

DNA	5µg
10x PCR-Puffer	5µl
dNTPs (jeweils 1,25mM)	8µl
25pmol/µl 5'Primer	1µl
25pmol/µl 3'Primer	1µl
2,5U Taq-Polymerase	0,5µl
A. bidest	ad 50µl

Das Reaktionsgemisch wurde kurz abzentrifugiert und mit 2 Tropfen Mineralöl als Verdunstungsschutz überschichtet. Die Amplifikation wurde nach einer einmaligen,

zehnminütigen Vordenaturierung bei 94°C in einem DNA Trio Thermoblock von Biometra nach folgendem Programm mit 30 Zyklen durchgeführt.

Denaturierung: 95°C, 1 Minute  
Annealing: 60°C, 1 Minute  
Elongation: 72°C, 1 Minute  
Anzahl der Zyklen : 30  
Abschluss-Verlängerung: 72°C, 15 Minuten

Zur Kontrolle, ob das zu erwartende DNA-Fragment amplifiziert wurde, wurden nach Durchführung der PCR 30µl des Reaktionsansatzes auf einem Agarosegel (2%) einer Gelelektrophorese unterzogen.

### 3.8.2 Identifizierung Insert-positiver Bakterienklone mittels PCR-Screening

Nach einer ungerichteten Klonierung ist es mit Hilfe des PCR-Screenings möglich, Insert-positive Klone, bei denen die korrekte Insert-Orientierung vorliegt, zu identifizieren. Voraussetzung dafür sind ein in der Vektorsequenz und ein in der Insertsequenz bindender Primer. Zu einer Amplifikation der Insert-DNA kann es dabei nur kommen, wenn sich das Insert in der richtigen Orientierung in der Vektor-DNA befindet. Für das Screening wurden 10 Klone von einer Ampicillin-haltigen Agarplatte isoliert und in jeweils 15µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Davon wurden 10µl mit den insertspezifischen Primern für die PCR eingesetzt. Die

gelelektrophoretische Auftrennung des PCR-Ansatzes ermöglichte die Identifizierung positiver Klone und deren Insertgröße.

### 3.9 *pBlue-TOPO TA Cloning® Kit (VersionE)*

Dieses Kit von Invitrogen dient zur Insertion von Promotor-Sequenzen vor dem  $\beta$ -Galaktosidase Gen (*lacZ*) aus *E.coli* auf dem Vektor pBlue-TOPO. Um die Funktionalität des Promotors zu überprüfen, können sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* Tests durchgeführt werden. Zunächst wird die gewünschte Promotor-Sequenz durch PCR amplifiziert. Die Ligation erfolgt spontan durch einfaches Mischen von PCR-Produkt und Vektor pBlue-TOPO und mit hoher Effizienz bei einer Inkubation von 5 Minuten bei RT. Als nächster Schritt erfolgt die Transformation von TOP10 *E. coli*-Zellen, die Selektion von Bakterienkolonien, die das Hybridplasmid enthalten, die Aufreinigung der Hybridplasmide und die Charakterisierung ihrer Nukleotidsequenz. Wurde der entsprechende Promotor korrekt vor das *lacZ*-Gen des pBlue-TOPO-Vektors kloniert, können die entsprechenden eukaryontischen Zellen (KB-, HeLa<sup>tk-</sup>-, Cos7-Zellen) mit dem Expressionsplasmid transfiziert und die Funktionalität des Promotors mit Hilfe des  $\beta$ -Gal Assay Kits *in vitro* und mit Hilfe des  $\beta$ -Gal Staining Kits *in vivo* überprüft werden.

### ***3.10 Quality Control $\beta$ -Gal Assay Kit***

Das  $\beta$ -Gal Assay Kit wird deshalb so gerne zur Detektion bei Transfektions-Versuchen mit eukaryotischen Zellen eingesetzt, weil das Genprodukt, die  $\beta$ -Galaktosidase, nicht durch die Proteolyse beim Zelllysieren zerstört wird und ihre Aktivität leicht nachzuweisen ist, z.B. durch die Umsetzung von ortho-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) zu ONP. Die Hydrolysereaktion von ONPG zu ONP induziert eine Gelbfärbung, was als Grundlage dieses Kits dient. Diese Gelbfärbung kann mittels eines Photometers quantifiziert werden. Der Absorbtionspeak liegt bei 420nm.

### ***3.11 Quality Control $\beta$ -Gal Staining Kit***

Mit Hilfe des Quality Control  $\beta$ -Gal Staining Kits von Invitrogen ist es möglich, den prozentuellen Anteil der Zellen mit einem exprimierten lacZ-Gen zu bestimmen.  $\beta$ -Galaktosidase katalysiert die Hydrolyse von  $\beta$ -Galaktosiden, z.B. X-gal, die dabei auftretende Blaufärbung ist unter dem Mikroskop leicht zu detektieren.

### ***3.12 Zellkultur***

Sämtliche, für die Zellkultur benötigten Lösungen, Medien und Puffer wurden sterilfiltriert und gekühlt gelagert. Vor Verwendung wurden alle Lösungen im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen

### *3.12.1 Kultivierung von Zelllinien*

Die Kultivierung etablierter Zelllinien erfolgte in beschichteten Zellkulturflaschen oder Zellkulturschalen in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und nahezu 100% Luftfeuchtigkeit in Kompletmedium (DMEM, 10% fetales Kälberserum). In Abhängigkeit von ihrer Konfluenz (Wachstumsdichte) wurden die Zellen alle 2 bis 4 Tage passagiert. Falls die gewünschte Konfluenz noch nicht erreicht war, wurde lediglich ein Mediumwechsel durchgeführt.

### *3.12.2 Passagieren von Zellen*

Bei Erreichen der Konfluenz (80-100%) erfolgte die Passage der Zellen. Dafür wurde das Medium mit Hilfe einer Pipette entfernt, die Zellen anschließend mit PBS<sup>±</sup> gewaschen. Danach wurde 0,25%-ige Trypsinlösung (VT) zugegeben, das Zellkulturgefäß geschwenkt und die VT-Lösung unmittelbar wieder entfernt. Je nach Zelllinie war eine Inkubation von 2-4 Minuten nötig, damit sich die Zellen vom Boden der Zellkulturgefäße lösten. Die abgelösten Zellen wurden in Vollmedium resuspendiert und im Verhältnis von 1:10 bis 1:20 in neue Zellkulturgefäße mit Kompletmedium ausgesät.

### *3.12.3 Lagerung von Zellen*

Zur Lagerung von Zellen wurden Zellstocks angelegt. Dafür wurden nicht konfluent (50%) gewachsene Zellen wie oben beschrieben passagiert und in 10ml Vollmedium

resuspendiert. Im Anschluss daran wurde die Zellsuspension bei 300xg für 3 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2ml Einfriermedium (Komplettmedium mit 20% fetalem Kälberserum und 10% DMSO) aufgenommen. Jeweils 1ml der Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden mit Zellstoff umwickelt und 24 Stunden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Anschließend wurden sie zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

#### *3.12.4 Koloniebildung Puromycin-resistenter Zellen*

Nach erfolgter Elektroporation wurden die transfizierten Zellen in Vollmedium auf 14,5-cm-Durchmesser-Zellkulturschalen ausgesät und im  $\text{CO}_2$ -Inkubator kultiviert. Nach 24 Stunden wurde mit der Selektion begonnen. Das Vollmedium wurde getauscht gegen ein Vollmedium, dem das Antibiotikum Puromycin in einer Konzentration von  $0,5\mu\text{g}/10\text{ml}$  Medium zugefügt wurde. Die benötigte Menge an Puromycin wurde zuvor durch Zytotoxizitätstests bestimmt, damit untransfizierte Zellen nach einem Zeitraum von 1 Woche absterben. Nach 6 Tagen konnte man das Auswachsen erster Klone beobachten. Nach ca. 16 Tagen war die Isolierung erster Klone mit Hilfe von Klonierungsringen möglich.

#### *3.13 Transfektion von eukaryotischen Zellen*

Die Transfektion eukaryotischer Zellen erfolgte nach der Methode der Lipofektion oder der Elektroporation.

### 3.13.1 Lipofektion

Die Lipofektion erfolgte mit Polyfectin nach Angaben des Herstellers Biontex (Lipofektamin-Methode Felgner und Ringold, 1989). In einer six-well Zellkulturschale wurden  $2,5 \times 10^4$  Zellen pro well in 2ml Vollmedium ausgesät. Anschließend wurden die Zellen für 18-24 Stunden bei 37°C in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator belassen, bis sie vor Transfektionsbeginn die gewünschte Dichte von einer Konfluenz von 50-80% erreicht hatten.

Für die Lipofektion war es erforderlich, die folgenden Lösungen vorzubereiten: Lösung A: In einem Eppendorf-Tube wurden jeweils 1µg des Expressionsplasmids und 1µg des Reporterplasmids mit jeweils 60µl Transfektionsmedium (Serum- und Antibiotika-freies Medium) gemischt. Lösung B: Pro Polystyrol-Röhrchen wurden 10µl Polyfectin mit 60µl Transfektionsmedium vermischt. Die Lösungen A und B wurden vorsichtig gemischt und für 30 Minuten bei RT zur DNA-Liposomen-Komplex-Bildung inkubiert. Kurz vor Beendigung der Inkubationszeit wurden die zu transfizierenden Zellen mit Transfektionsmedium gewaschen. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde zu jedem Transfektionsansatz 800µl Transfektionsmedium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) hinzugefügt. Die zu transfizierenden Zellen wurden mit dem Transfektionsansatz überschichtet und für 6 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach 6 Stunden wurde die Transfektionslösung durch 2ml frisches Vollmedium ersetzt und die Zellen wurden weitere 36 Stunden im CO<sub>2</sub>-Inkubator gehalten.

### 3.13.2 Elektroporation

Diese Methode wurde für eine höhere Transfektionseffizienz zur Herstellung von stabilen Zelllinien angewandt (modifizierte Methode von Melkonyan et al., 1996). Die Zellen für die Transfektion wurden wie für eine Zellpassage gewaschen und trypsiniert und anschließend in DMEM aufgenommen. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 4°C bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einem berechneten Volumen DMEM gelöst, so dass jeder 350µl Ansatz  $8 \times 10^6$  Zellen enthielt. In einem Eppendorf-Tube wurde die zu transfizierende DNA mit der Zellsuspension vermischt und anschließend blasenfrei in eine Elektroporationsküvette überführt. Die zu transfizierende DNA hatte dabei ein Verhältnis von CAT-Gen zu Resistenzgen von 15:1 (Zhang et al., 2000). Bei dem CAT-Gen handelte es sich um pBLCAT3-LV bzw. um den E2<sub>Ad12</sub>-Promotor in pBLCAT3, bei dem Resistenzgen um pBabe-Puro. Nach einer Inkubationszeit von 1 Minute bei RT erfolgte die Elektroporation bei einer Spannung von 275 Volt, einer Kapazität von 975 Mikروفarad und einer Zeitkonstanten von 30 Sekunden. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5 Minuten bei RT, danach wurden die transfizierten Zellen in Vollmedium auf 14,5-cm-Durchmesser-Zellkulturschalen ausgesät und im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Vollmedium ausgetauscht gegen ein Vollmedium, das zusätzlich Puromycin zur Selektion enthielt.

### 3.14 Bestimmung der CAT-Aktivität in Zellextrakten

Das Enzym Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) kann das Antibiotikum Chloramphenicol durch Acetylierung einer oder beider Hydroxylgruppen inaktivieren und

damit bei Bakterien eine Resistenz gegen dieses Antibiotikum verursachen. Das Enzym selbst kommt in eukaryotischen Zellen nicht vor, aber das prokaryontische Gen ist in diesen Zellen komplett funktionsfähig. Aus diesem Grund ist die CAT-Aktivität besonders gut zum Studium der Genexpression in eukaryotischen Zellen geeignet, da hier keine endogen vorhandene Enzymaktivität das Messergebnis verfälschen kann. Für transiente Expressionsanalysen wird der zu untersuchende Promotor vor das CAT-Gen kloniert. Wird nach dem Einschleusen der DNA-Konstrukte in Säugerzellen eine CAT-Aktivität gemessen, so ist damit bewiesen, dass der zu untersuchende Promotor aktiv ist. Zusätzlich können Aussagen über die Stärke des zu untersuchenden Promotors gemacht werden.

Die Bestimmung der CAT-Aktivität transient transfizierter eukaryotischer Zellen erfolgte nach Brockmann et al. (1996). Grundlage des Verfahrens ist die Überführung von <sup>14</sup>C-markiertem Chloramphenicol in seine acetylierten Formen, wobei Acetyl-Coenzym A als Donor für die Acetyl-Gruppen dient. Durch Dünnschicht-Chromatografie können das unveränderte Chloramphenicol und die mono- oder diacetylierten Formen aufgrund ihres unterschiedlichen Laufverhaltens im Laufmittel wieder voneinander getrennt werden.

Die Zellernte erfolgte bei transient transfizierten eukaryotischen Zellen nach Kultivierung für 48 Stunden in einem Vollmedium mit nur 0,25% mit einer anschließenden Stimulationsphase von 24 Stunden mit 20µM Forskolin. Der gesamte Prozess der Zellernte wurde auf Eis durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und anschließend mit Hilfe eines Gummischabers in 1ml PBS<sup>-</sup> abgelöst. Die Zellsuspension wurde in einem Eppendorf-Tube bei 4°C für 3 Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 100µl 0,25M Tris/HCl, pH7,5 resuspendiert. Danach erfolgte durch fünfmaliges abwechselndes Schockgefrieren (in flüssigem Stickstoff) und Auftauen (37°C Wasserbad, 5 Minuten) der Zellaufschluss. Nach dem letzten

Auftauvorgang wurde die Suspension für 10 Minuten bei 1400 rpm bei 4°C zentrifugiert, was zu einer Auftrennung in Zelltrümmer in Form des Pellets und Gesamtzellextrakt in Form der flüssigen Phase führte. Die Bestimmung der Proteinkonzentration des Gesamtzellextraktes erfolgte nach der Methode nach Bradford. Der Zellextrakt wurde entweder sofort weiter benutzt oder schockgefroren bei -20°C gelagert.

Zur Messung der CAT-Aktivität wurde ein Probenansatz bereitet aus:

20µg Protein (entspricht Xµl Gesamtzellextrakt)

2µl [<sup>14</sup>C]-Chloramphenicol

25µl einer 4mM Acetyl-CoA-Lösung (in 0,25M Tris/HCl, pH7,5)

add 150µl mit 0,25M Tris/HCl, pH7,5

Danach erfolgte eine Inkubation des Ansatzes von 2 Stunden bei 37°C. Im Anschluss daran wurde dem Ansatz 1ml Ethylacetat zugefügt, dann 30 Sekunden durch Vortexen vermischt und 2 Minuten bei 6000 rpm bei 4°C zentrifugiert. 980µl der Ethylacetat-Phase, die acetyliertes Chloramphenicol enthält, wurde entnommen und für 30 Minuten mittels eines „Speedvac“ Vakuumtrockners eingedampft. Nach Resuspension in 20µl Ethylacetat wurde die Probe auf eine Kieselgel-Dünnschicht-Chromatografieplatte aufgetragen. Anschließend erfolgte die Chromatografie zur Auftrennung des nicht acetylierten Chloramphenicols sowie der mono- und diacetylierten Form für 45 Minuten in einer dampfdruckgesättigten DC-Kammer. Als Laufmittel diente dabei ein Chloroform-Methanol-Gemisch im Verhältnis 19:1. Die Quantifizierung des [<sup>14</sup>C]-markierten Chloramphenicols (und somit der CAT-Aktivität) erfolgte nach Trocknung der Dünnschicht-Chromatografie-Platte mit dem „Automatic TLC-

Linear Analyzer“ der Firma Berthold. Zum Schluss wurden die Dünnschicht-Chromatografieplatten für 24 Stunden bei RT gegen einen Röntgenfilm exponiert.

Die Durchführung der CAT-Assays erfolgte durch Frau Ulla Schmücker.

### **3.15 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wässriger Lösungen erfolgte nach der Methode von Bradford (1976) mit dem „BioRad Bradford-Reagenz“. Dabei wurden 5µl des Gesamtzellextraktes mit 200µl Bradford-Reagenz gemischt und die Lösung bis zu einem Volumen von 1ml mit A. bidest aufgefüllt. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei RT im Dunkeln wurde die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 595nm durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels einer mit BSA erstellten Eichkurve bestimmt.

### **3.16 Isolierung und Analyse von Proteinen**

#### **3.16.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die spezifische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch die Methode der denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) im diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli (Laemmli, 1970). Nach den Anweisungen der Methodensammlung „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel et. al., 1997) wurden Sammel- und Trenngele hergestellt. Es wurden Sammelgele mit einer Konzentration von 5% (C-Wert = 2,7%) und Trenngele mit einer Konzentration von 12% (C-Wert = 2,7%)

eingesetzt. Zur Denaturierung wurden die Proteine in SDS-Probenpuffer für 5 Minuten bei 100°C im Wasserbad gekocht und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld wurde in einer Mini-Protean-II-Dual-SLAB-Cell-Kammer (BioRad) durchgeführt. Als Spannung wurden für die Elektrophorese zunächst 70V für ca. 15 Minuten und dann 140V für die restliche Zeit gewählt.

Nach dem Gellauf wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel mit den aufgetrennten Proteinen mit Hilfe der Methode der Western-Blot-Analyse untersucht.

### *3.16.2 Western-Blot-Analyse (Harlow und Lane, 1988)*

Grundlage des Verfahrens der Western-Blot-Analyse ist die Übertragung zuvor elektrophoretisch aufgetrennter Proteine von dem Trenngel auf einen geeigneten Trägerfilter wie z.B. einer Nitrocellulose- oder Nylonmembran, wodurch eine exakte Kopie des Trennmusters der Proteinmoleküle erstellt wird. Auf dem Trägerfilter werden die Proteine immobilisiert, sowohl die Immunreaktivität, als auch die funktionelle (z.B. enzymatische) Aktivität der Proteine bleiben jedoch unter geeigneten Bedingungen erhalten, was man z.B. zur Identifikation und quantitativen Bestimmung der Proteine ausnutzen kann.

Zum Nachweis spezifischer Proteine wurden 30µg Proteine aus Gesamtzellextrakt zunächst mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und dann auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond C extra, Amersham) transferiert. Dazu wurden zuerst das zu analysierende Gel und eine gleich große Nitrozellulosemembran für 10 Minuten in einem Transferpuffer equilibriert. Anschließend erfolgte die Übertragung der Proteine auf die Membran in einer Semi-dry-Blotting-Apparatur (BioRad) bei einer Stromstärke von 70mA

für 1 Stunde. Nach dem zweimaligen Waschen der Membran mit TBS für jeweils 5 Minuten erfolgte die Blockierung durch eine Inkubation in einem TBS-Blockierungspuffer für 30 Minuten bei RT unter leichtem Schütteln. Der Blockierungspuffer wurde danach entfernt und die Membran mit einem spezifischen primären Antikörper im Blockierungspuffer überschichtet. Nach Inkubation von ca. 120 Minuten bei RT unter leichtem Schütteln wurde die Membran mehreren Waschschritten (1x15 Minuten, 3x5 Minuten) jeweils in TBS/Tween 20 unterzogen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem sekundären spezifischen Antikörper (Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper, Peroxidase-konjugiert) in einer Lösung aus 1x TBS, 0,1% Tween 20 und 0,5% Milchpulver für 1 Stunde bei RT. Danach wurde die Membran wieder mehreren Waschschritten unterzogen:

1 x 15 Minuten 1x TBS, 0,1% Tween 20

3 x 5 Minuten 1x TBS, 0,1% Tween 20

1 x 5 Minuten 1x TBS, 0,1% Tween 20

1 x 5 Minuten 1x TBS

Die Peroxidasereaktion wurde hervorgerufen durch Inkubation in 3ml ULTRA Luminol/Enhancer Solution und ULTRA Stable Peroxide Solution (Pierce) (Verhältnis 1:1) für 5 Minuten gemäß den Angaben des Herstellers Pierce. Je nach Intensität der Chemilumineszenz erfolgte die Exposition eines Röntgenfilms gegen die Membran für einen Zeitraum von 10 Sekunden bis 10 Minuten.

Sollte die Membran anschließend weiteren Antikörperreaktionen unterzogen werden, wurden die bestehenden Antigen-Antikörperkomplexe durch Inkubation in 1xTBS/0,2% Tween 20 für 45 Minuten bei 70°C unter leichtem Schütteln dissoziiert. Danach wurde die Membran kurz in 1x TBS gewaschen und entweder der nächsten Antikörperreaktion unterzogen oder in 1x TBS bei 4°C gelagert.

## 4. Ergebnisse

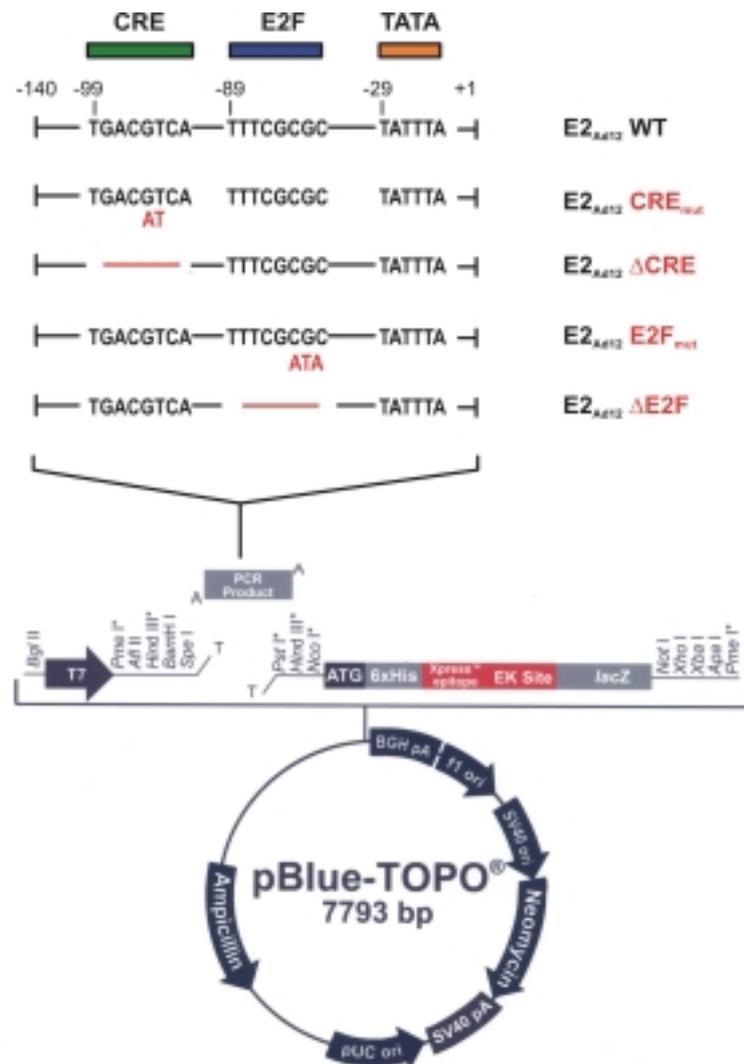
Die zu Beginn meiner Dissertation vorliegenden Ergebnisse über die Modulation des cAMP/PKA-abhängigen Signaltransduktionsweges durch das Ad12-E1A<sub>12S</sub>-Onkoprotein wurden ausschließlich durch transiente Expressionsassays mit dem E2-Promotor des Adenovirus Typ 12 durchgeführt, der aufgrund eines CRE-Promotorelements über die Transkriptionsfaktoren CREB/ATF-1 und den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg reguliert wird (Fax et al., 2001).

Transfizierte Vektor-DNA wird, nachdem sie in den Kern transportiert wurde, durch Bindung von Histonproteinen in Chromatin-ähnliche Strukturen verpackt, die jedoch nur annähernd den Chromatinstrukturen des Wirtsgenoms entsprechen. Um die Aktivierung von ins Wirtsgenom integrierten Genen durch den cAMP/PKA-Signalweg und die E1A-Proteine genauer zu studieren, sollte ich eine humane Zelllinie etablieren, die einen geeigneten Expressionsvektor enthält, der kovalent in die Wirts-DNA integriert vorliegt. Der Expressionsvektor sollte den Ad12-spezifischen E2-Promotor (Wild-Typ oder E2-Promotormutanten) und ein Reporter gen enthalten. Als Erstes wurden von mir daher die zur vorgesehenen kovalenten Integration verwendeten Expressions-Reporter genkonstrukte hergestellt.

### ***4.1 Klonierung des E2<sub>Ad12</sub>-WT-Promotors und verschiedener Promotormutanten in den Expressionsvektor pBlue-TOPO***

Um die Aktivierung eines in das Wirtsgenom integrierten E2<sub>Ad12</sub>-WT-Promotors und der E2<sub>Ad12</sub>-Promotormutanten (E2<sub>Ad12</sub>-CRE<sub>mut</sub>, E2<sub>Ad12</sub>-ΔCRE, E2<sub>Ad12</sub>-E2F<sub>mut</sub>, E2<sub>Ad12</sub>-ΔE2F)

analysieren zu können, habe ich als Erstes die entsprechenden E2<sub>Ad12</sub>-Promotorsequenzen über eine BamHI-Restriktionsschnittstelle vor das lacZ-Gen in den promotorlosen Expressionsvektor pBlue-TOPO kloniert (siehe Abb. 6).



**Abb. 6: Schematische Darstellung der Klonierung des E2<sub>Ad12</sub>-WT- und der E2<sub>Ad12</sub>-Promotormutanten in den promotorlosen Expressionsvektor pBlue-TOPO.** Die E2<sub>Ad12</sub>-Promotorsequenzen wurden über die BamHI-Schnittstelle in den Expressionsvektor kloniert.

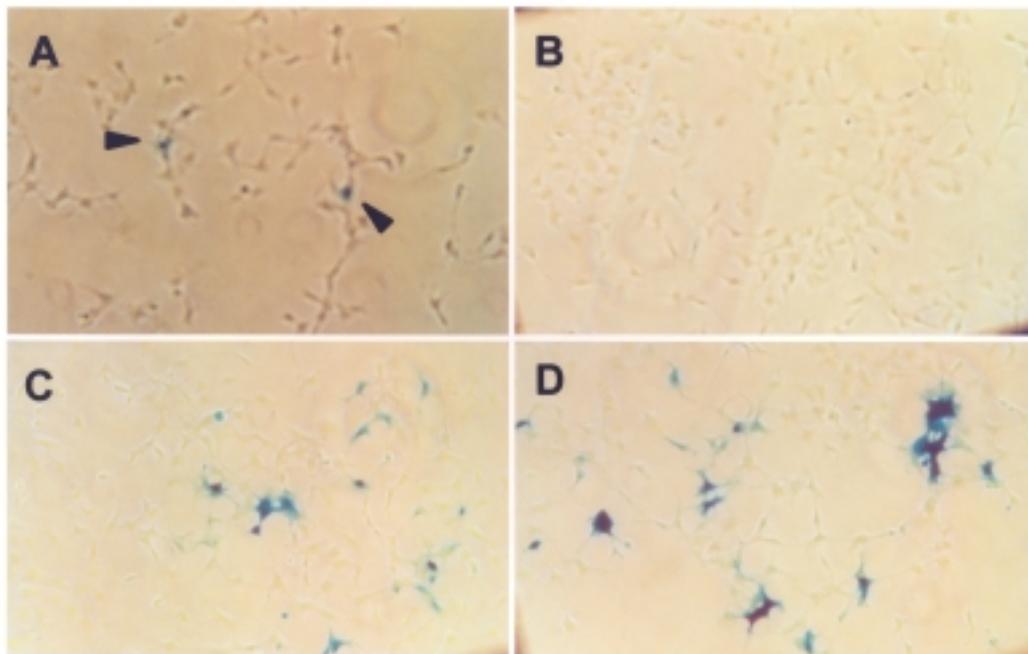
Das lacZ-Reportergen, 3' vom Promotor gelegen, sollte einen quantitativen Nachweis der Expression des Reportergens nach Aktivierung des E2<sub>Ad12</sub>-Promotors sowohl *in vitro* (Quality Control  $\beta$ -Gal Staining Kit, Invitrogen), als auch einen qualitativen Nachweis *in vivo* (Quality Control  $\beta$ -Gal Assay Kit, Invitrogen) ermöglichen.

Die korrekte Klonierung des E2<sub>Ad12</sub>-WT-Promotors und der entsprechenden Mutanten in den pBlue-TOPO-Expressionsvektor wurde durch die Sequenzierung von PCR-Produkten der verschiedenen Promotorelemente bestätigt (Daten werden nicht gezeigt).

#### ***4.1.1 Nachweis der Funktionalität des E2<sub>Ad12</sub>-WT-Promotors und der vier von ihm abgeleiteten Mutanten im Reporterkonstrukt pBlue-TOPO***

Um die Funktionalität der in den Expressionsvektor eingeführten Promotoren zu zeigen, wurde der Expressionsvektor E2<sub>Ad12</sub>-WT/pBlue-TOPO allein (Kontrolle) und mit einem das E1A<sub>12S</sub>-Protein exprimierenden Expressionsvektor (pRs/RSV-E1A<sub>12S</sub>) durch Elektroporation in KB-Zellen kotransfiziert. 48 bzw. 72 Stunden nach Transfektion wurde die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase mit Hilfe eines „Quality Control  $\beta$ -Gal Staining Kits“ (Invitrogen) nach Anweisungen des Herstellers bestimmt. Die ersten Experimente zeigten allerdings, dass entweder das Nachweisverfahren der  $\beta$ -Galaktosidase nicht sensitiv genug war, um die Aktivität der Reporterkonstrukte zu detektieren oder die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase in den transfizierten Zellen zu gering war. Deshalb wurde eine Optimierung der Versuchsbedingungen angestrebt. Es wurden (1) verschiedene DNA-Mengen für die Transfektion, (2) verschiedene Transfektionsmethoden (Polyfektin, Elektroporation) und (3) unterschiedliche Zelllinien (KB, COS7) verwendet. Zudem wurde (4) versucht, den E2<sub>Ad12</sub>-WT-Promotor in Gegenwart der E1A-Proteine mit cAMP zusätzlich zu stimulieren. Da auch

diese Optimierungen zu keinen nennenswerteren positiven  $\beta$ -Galaktosidase Expressionsdaten führten, wurde (5) der  $E2_{Ad12}$ -Promotor im Expressionsvektor durch den in KB- und COS7-Zellen sehr aktiven CMV-Promotor ersetzt. Außerdem wurde, neben dem *in vitro*-Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression (Gelbfärbung von Zelllysaten durch Hydrolyse von ONPG zu ONP), die Blaufärbung der  $\beta$ -Galaktosidase exprimierenden Zellen durch die Hydrolyse des  $\beta$ -Galaktosids X-gal unter dem Mikroskop untersucht. Unter diesen optimierten Bedingungen ließ sich eine, wenn auch nur sehr geringe, hellblaue Färbung durch Koexpression von  $E1A_{12S}$ -WT-Protein und der PKA-C $\alpha$  Untereinheit erreichen. Die Zellen mit dem Kontrollvektor bzw. mit dem CMV-Promotorkonstrukt waren dunkelblau und zeigten damit eine mehr als 20fach stärkere Anfärbung der Zellen (siehe Abb. 7).



**Abb. 7: Aktivierung des  $E2_{Ad12}$ -Promotors im Expressionsvektor  $E2_{Ad12}$ -WT/pBlue-TOPO durch  $E1A_{12S}$ -Funktionen.** KB-Zellen wurden entweder mit dem Expressionsvektor pBL- $E2_{Ad12}$ -WT/pBlue-TOPO alleine (Kontrolle), oder zusätzlich mit dem Expressionsvektor pRc/RSV- $E1A_{12S}$  (exprimiert das  $E1A_{12S}$ -Protein) transfiziert (Elektroporation) und 48 Stunden nach Transfektion die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase in den Zellen mit Hilfe eines „Quality Control  $\beta$ -Gal Staining Kits“ (Invitrogen) nach Anweisungen des Herstellers bestimmt.

(A)  $\beta$ -Gal-Expression in Gegenwart und (B) in Abwesenheit von E1A<sub>12S</sub>-Protein; (C) Kontrollvektor des „Quality Control  $\beta$ -Gal Staining Kits“ (Invitrogen, pcDNA3.1/His/LacZ, Positivkontrolle); (D) pBlue-TOPO-Expressionsvektor mit CMV-Promotor (CMV/pBlue-TOPO).

Da die  $\beta$ -Galaktosidase-Expression als Indikator für die Aktivität des E2<sub>Ad12</sub>-Promotors in den verwendeten Zellen nicht sensitiv genug zu sein schien, wurde auf ein anderes Reporterogen/Expressionssystem, auf das Chloramphenicolacetyl-Transferase-Gen, zurückgegriffen, von dem bereits bekannt war, dass sich das Genprodukt des Chloramphenicolacetyl-Transferase-Gens in den verwendeten KB- und COS7-Zellen auch in geringeren Mengen gut nachweisen lässt.

#### **4.2 Struktur des E2<sub>Ad12</sub>-Promotor/Reporterogenkonstruktes pBL-E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT und Nachweis seiner Funktionalität**

In transienten Expressionsstudien hatte Dr. Peter Fax in unserem Labor bereits nachgewiesen, dass die Expression des Reporterogens Chloramphenicolacetyl-Transferase auch in geringen Mengen in Zellen mit einem entsprechenden CAT-Assay gut nachgewiesen werden kann. Deshalb wechselte ich zu einem Reporterkonstrukt, das an Stelle des lacZ- das CAT-Gen trug. Die Abb. 8 zeigt die Struktur des Vektors und die, vor das CAT-Reporterogen über eine BamHI-Schnittstelle integrierten, E2<sub>Ad12</sub>-Promotorsequenzen. Bevor ich dieses E2<sub>Ad12</sub>-Promotor/Reporterogenkonstrukt (bezeichnet als pBL-E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT) zur Generierung einer Zelllinie verwendete, habe ich es nochmals auf seine Funktionalität geprüft.

Hierzu wurden KB-Zellen entweder mit dem Expressionsvektor pBL-E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT alleine (Kontrolle) oder zusätzlich mit den Expressionsvektoren pRc/RSV-E1A<sub>12S</sub> (exprimiert das E1A<sub>12S</sub>-Protein) oder pRSV-CHO-PKA-C $\alpha$  (exprimiert die katalytische PKA-

Untereinheit) transfiziert und 48 Stunden nach Transfektion die CAT-Aktivität in Zellextrakten der entsprechenden Zellen gemessen.

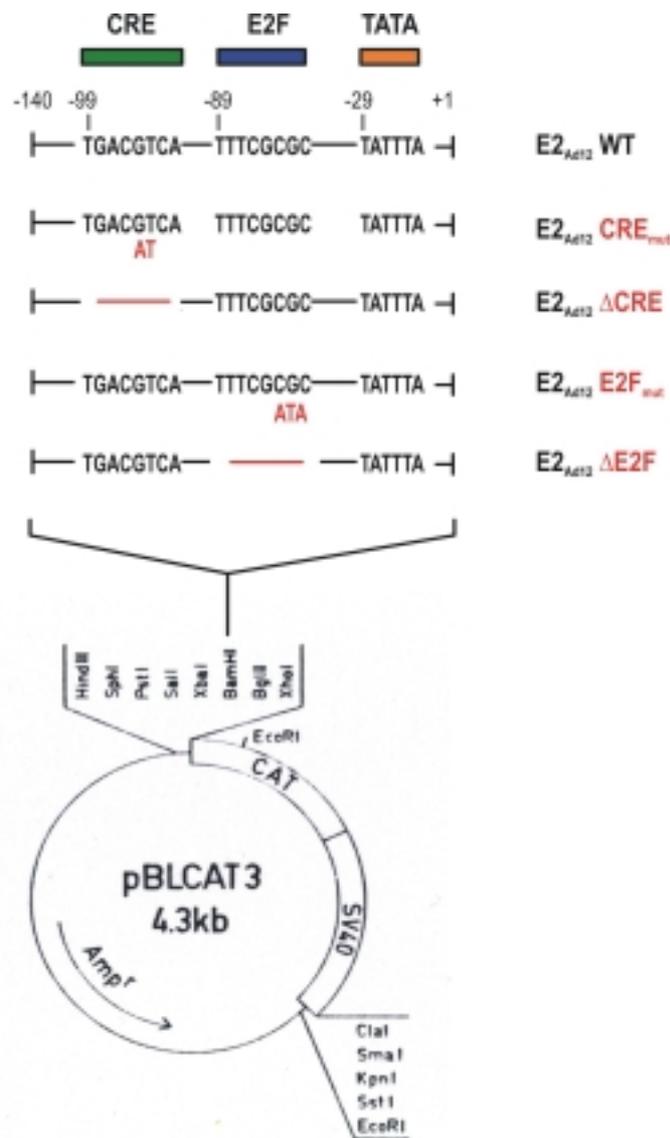
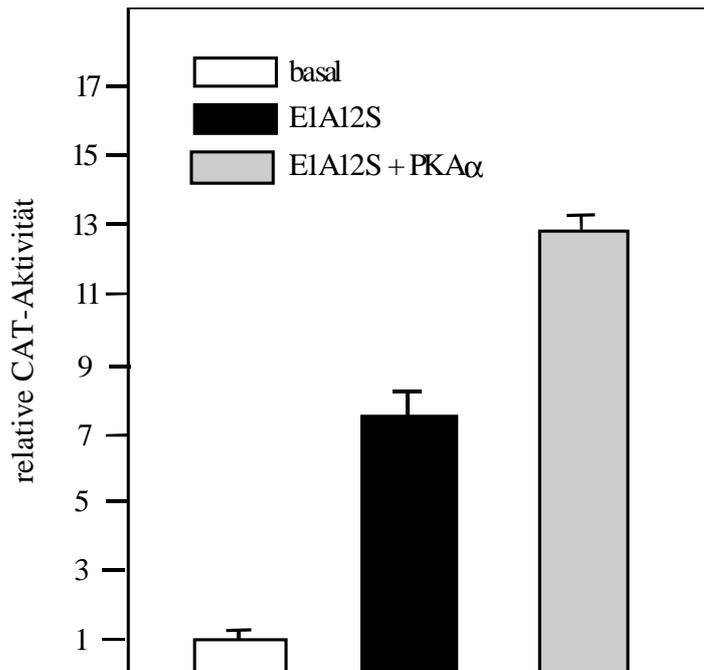


Abb. 8: Schematische Darstellung der Klonierung des E2<sub>Ad12</sub>-WT- und der E2<sub>Ad12</sub>-Promotormutanten in den promotorlosen Expressionsvektor pBLCAT3. Die E2<sub>Ad12</sub>-Promotorsequenzen wurden über die BamHI-Schnittstelle in den Expressionsvektor kloniert.

Die Abb. 9 dokumentiert (a) die Aktivierung des  $E2_{Ad12}$ -Promotors durch die Expression des  $E1A_{12S}$ -Proteins und (b) eine zusätzliche Stimulierung der Promotoraktivität durch die Koexpression der katalytischen PKA-C $\alpha$ -Untereinheit.



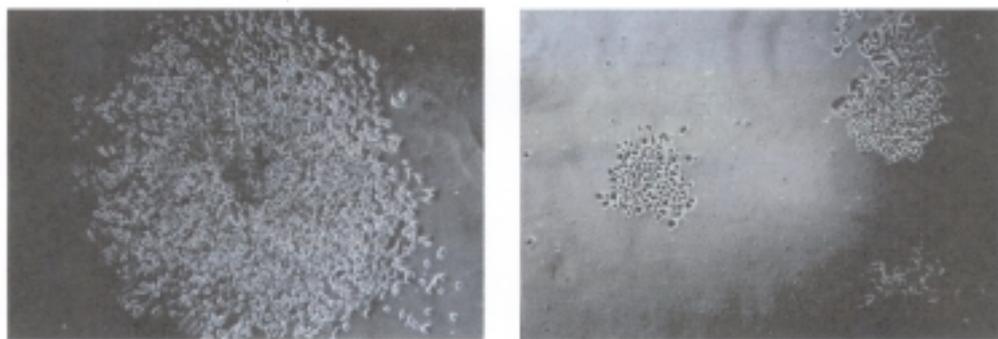
**Abb. 9: Aktivierung des  $E2_{Ad12}$ -Promotors im Expressionsvektor pBL- $E2_{Ad12}$ -WT/CAT durch  $E1A_{12S}$ - und PKA-C $\alpha$ -Funktionen.** KB-Zellen wurden entweder mit dem Expressionsvektor pBL- $E2_{Ad12}$ -WT/CAT alleine (Kontrolle) oder zusätzlich mit den Expressionsvektoren pRc/RSV- $E1A_{12S}$  (exprimiert das  $E1A_{12S}$ -Protein) oder pRSV-CHO-PKA-C $\alpha$  (exprimiert die katalytische PKA-Untereinheit) transfiziert und 48 Stunden nach Transfektion wurde die CAT-Aktivität in Zellextrakten der entsprechenden Zellen gemessen.

#### 4.3 Etablierung von Zelllinien mit kovalent in das Wirtsgenom integriertem pBL- $E2_{Ad12}$ -WT/CAT Expressionsplasmid

Zur Etablierung von Zelllinien mit integriertem Expressionsplasmid wurden KB-Zellen, später auch Hela<sup>tk-</sup>-Zellen, mit den Expressionsplasmiden pBL- $E2_{Ad12}$ -WT/CAT und dem Expressionsvektor pBabe-Puro, einem Expressionsplasmid, das den Selektionsmarker

Puromycin exprimiert, kotransfiziert (Elektroporation). Dabei wurde ein Vektor-DNA-Mengenverhältnis von pBL-E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT zu pBabe-Puro von 15:1 gewählt (nach Zhang et.al., Cell, 2000). Da die Menge an Vektor-DNA, die den Selektionsmarker exprimiert, sehr viel geringer war als die des E1A<sub>12S</sub>-Protein-exprimierenden Vektors, war davon auszugehen, dass ein resistenter Klon mit hoher Wahrscheinlichkeit auch das gewünschte CAT-Konstrukt enthielt.

Am Tag 1 wurde die Elektroporation durchgeführt, wobei pro Ansatz  $8 \times 10^6$  KB-Zellen eingesetzt wurden. Ab Tag 2 wurde dem Medium das Antibiotikum Puromycin zur Selektion von Puromycin-resistenten Zellen zugefügt. Dabei wurde die Konzentration so gewählt, dass es bei Zellen ohne Resistenzgen-Expression zum Absterben der Zellen innerhalb einer Woche kam. Nach 6 Tagen der Selektion unter Puromycin konnte das Auswachsen erster Klone zu Foci beobachtet werden. Nach durchschnittlich 16 Tagen waren die Foci groß genug, um sie mit dem bloßen Auge gut zu erkennen, jedoch noch klein genug, um sie voneinander gut abzugrenzen. Ein Beispiel von Puromycin-resistenten Klonen ist in Abb. 10 gezeigt. Zu diesem Zeitpunkt fand auch die Isolierung der Foci mit Hilfe von Klonierungsringen statt.



**Abb. 10: Puromycin-resistente KB-Zellklone** 16 Tage nach Transfektion mit den Expressionsplasmiden pBL-E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT und pBabe-Puro und Selektion in Puromycin enthaltendem Medium.

Klone, aus denen Zelllinien gezogen werden sollten, wurden durchschnittlich 36 Tage kultiviert, um genügend Zellen zum Einfrieren, für weitere Zellkulturen und für die Präparation von genomischer DNA zu haben. Genomische DNA wurde benötigt, um die Klone mit Hilfe von PCR-Analysen auf integrierte pBL-E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT-Vektorsequenzen zu untersuchen.

In gleicher Weise wurden parallel Puromycin-resistente Hela<sup>tk</sup>-Zellklone, die das pBL-E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT-Konstrukt kovalent in das Wirtsgenom integriert hatten, gewonnen und von ihnen Zelllinien etabliert (Daten nicht gezeigt).

#### ***4.3.1 Identifikation von Zellklonen mit kovalent integriertem pBL-E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT-Expressionsvektor***

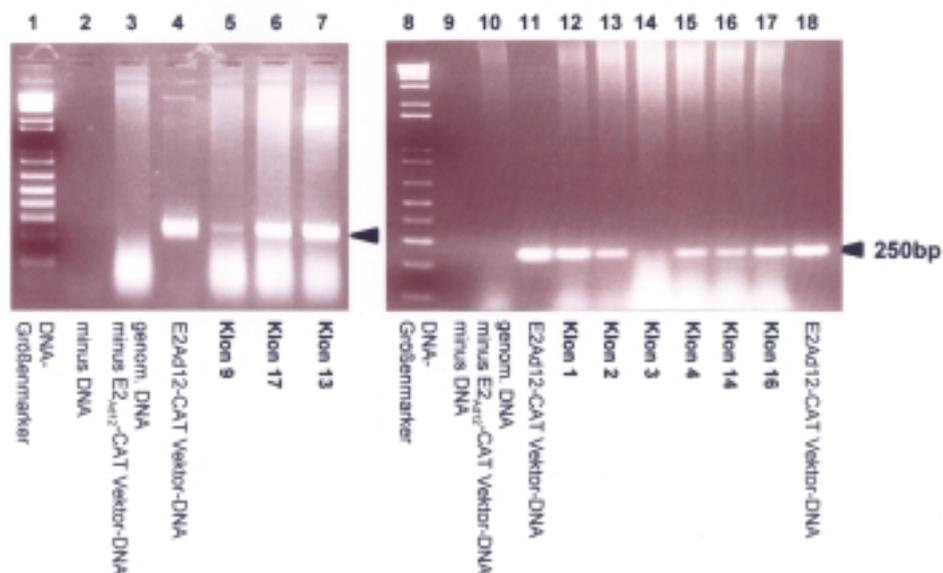
Puromycin-resistente KB-Zellklone, die den Expressionsvektor pBL-E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT kovalent in das Wirtsgenom integriert hatten, wurden mit Hilfe der PCR detektiert. In Vorversuchen wurden die Parameter für optimale PCR-Bedingungen ausgetestet: Es wurde die optimale DNA-Menge, die Primer, die Konzentration an Taq-Polymerase, die Temperatur, die Zyklenanzahl und die An- bzw. Abwesenheit von DMSO ermittelt (siehe Tab. 1).

DNA-Menge	5µg
5'-Primer, Menge	E2 <sub>Ad12</sub> -5'-Primer, 25pmol/µl
3'-Primer, Menge	pSP72, 25pmol/µl
Taq-Polymerase pro Ansatz	2,5 Units
Vordenaturierung	94°C, 10 min
Annealing-Temperatur	60°C
Anzahl der Zyklen	30

**Tabelle 1: Ermittelte optimale PCR-Bedingungen zum Nachweis der kovalent integrierten pBL-E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT-Expressionsvektor-Sequenzen**

Die Größe des erwarteten PCR-Produktes sollte etwa 250bp betragen, da der 5'-Primer Sequenzen upstream des CRE-Elements und der 3'-Primer Sequenzen in der Mitte des CAT-Gens erkennt.

Zur Detektion der integrierten pBL-E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT-Sequenzen wurde die genomische DNA der einzelnen Klone präpariert und mit Hilfe der PCR die E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT-spezifischen Vektorsequenzen amplifiziert. Die PCR-Produkte von 16 Klonen wurden dann mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Abb. 11 zeigt exemplarisch einige dieser PCR-Produkte, deren Größe durch Elektrophorese auf einem zweiprozentigen Agarosegel bestimmt wurde.



**Abb. 11: Detektion des in das Wirtsgenom integrierten pBL-E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT-Reporterkonstruktes mit Hilfe der PCR.** Mittels geeigneter Primer wurden spezifische pBL-E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT-Sequenzen von der genomischen DNA der Puromycin-resistenten Klone amplifiziert. Die Größe des erwarteten PCR-Produktes beträgt etwa 250bp, da der 5'-Primer Sequenzen 5' des CRE-Elements und der 3'-Primer Sequenzen in der Mitte des CAT-Gens erkennt. Die amplifizierten DNA-Sequenzen wurden anschließend auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

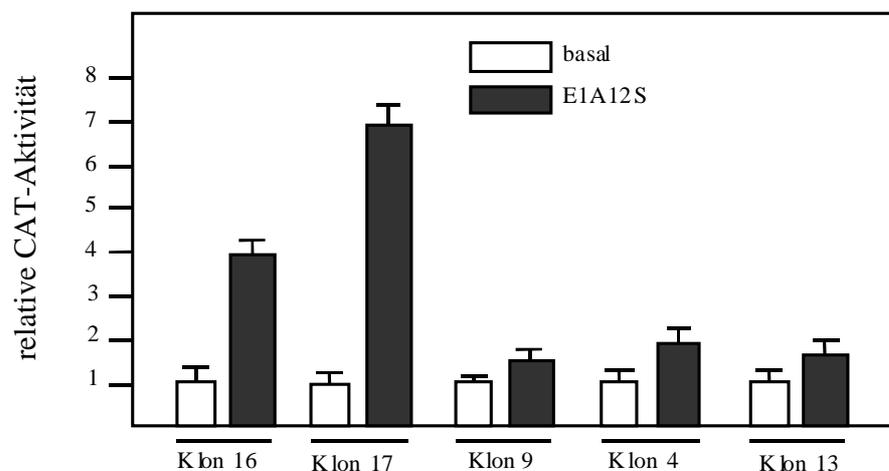
In den Spuren 5, 6, 7, 12, 13, 15, 16 und 17 der Abb. 11 sind PCR-Produkte der erwarteten Größe von ca. 250bp deutlich zu erkennen; in diesen Klonen hatte demzufolge eine Integration der pBL-E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT-Vektor-DNA in das Zellgenom stattgefunden. Die PCR mit genomischer DNA des Klons 3 (Spur 14) ergibt keine eindeutige Aussage. Als Positivkontrolle dienten 2,5ng amplifizierte pBL-E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT-DNA (Spur 4, 11 und 18); die Negativkontrollen enthielten entweder keine DNA im PCR-Ansatz (Spur 2 und 9) oder genomische DNA von KB-Zellen, die nicht mit der pBL-E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT-Vektor-DNA transfiziert wurden (Spuren 3 und 10). Als Größenmarker wurde eine sog. „1Kb Plus DNA-Ladder“ aufgetragen (Spur 1 und 8).

Von 16 getesteten Puromycin-resistenten Klonen wiesen 15 Klone aufgrund der PCR-Analysen eine Integration des pBL-E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT-Reporterkonstruktes in das Wirtsgenom auf. Die Bestimmung der Nukleotidsequenz einiger amplifizierter pBL-E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT-Expressionsvektor-Sequenzen zeigte, dass beim Integrationsprozess keine Mutationen entstanden waren (Daten nicht gezeigt).

#### **4.3.2 Analyse der Aktivierung des kovalent in das Wirtsgenom integrierten E2<sub>Ad12</sub>-WT-Promotors durch das E1A<sub>12S</sub>-Protein und die PKA-C $\alpha$ -Untereinheit**

Um zu prüfen, ob und wie effizient sich der E2<sub>Ad12</sub>-WT-Promotor des in das Wirtsgenom integrierten Expressionsplasmids durch E1A-Funktionen aktivieren lässt, wurde der Expressionsvektor pRc/RSV-E1A<sub>12S</sub> mittels Elektroporation in die einzelnen Klone gebracht, das E1A<sub>12S</sub>-Protein exprimiert und nach 48 Stunden die CAT-Aktivität in den Zellextrakten bestimmt. Bis auf die Zellen der Klone 16 und 17 ließ sich der E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT-Promotor in allen anderen Klonen im Vergleich zu den transienten Expressionsexperimenten

nur sehr ineffizient durch E1A<sub>12S</sub> aktivieren. Abb. 12 zeigt als Beispiel die Aktivierung der CAT-Expression der Klone 16 und 17 sowie der Klone 9, 4, und 13. Durch die zusätzliche transiente Expression der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A (PKA-C $\alpha$ ) ließ sich die Expression der Chloramphenicolacetyl-Transferase nicht wesentlich weiter steigern (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 12: E1A-Protein-spezifische Aktivierung des E2<sub>Ad12</sub>-WT-Promotors im pBL-E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT-Reporterkonstrukt in den KB-Klonen 4, 9, 13, 16 und 17.** Die KB-Klone wurden entweder mit dem Expressionsvektor pRc/RSV (Kontrolle) oder mit dem Expressionsvektor pRc/RSV-E1A<sub>12S</sub> (exprimiert das E1A<sub>12S</sub>-Protein) transfiziert (Elektroporation) und 48 Stunden nach Transfektion wurde die CAT-Aktivität in Zellextrakten der entsprechenden Zellen gemessen.

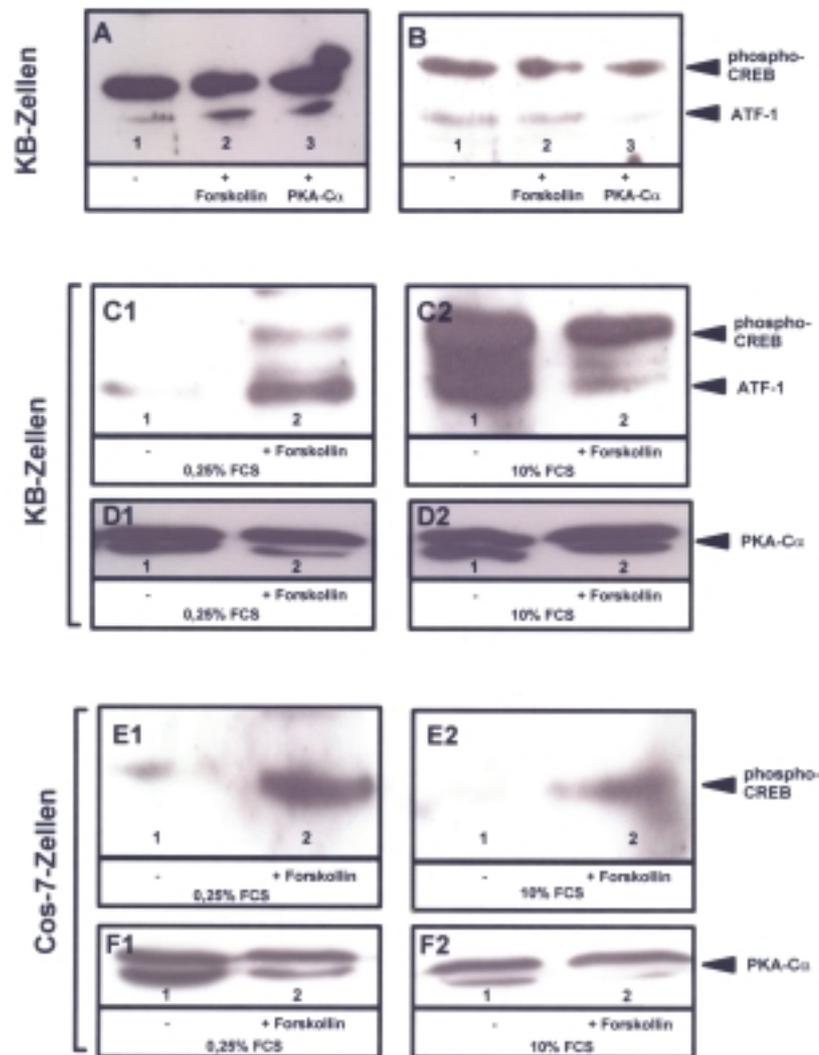
Da bekannt ist, dass der Transkriptionsfaktor CREB durch Phosphorylierung des Serinrestes-133 aktiviert wird, und da das E1A<sub>12S</sub>-Protein den E2<sub>Ad12</sub>-Promotor nur in Gegenwart von aktiviertem (phosphoryliertem) CREB aktivieren kann, habe ich mit Hilfe von Western-Blot-Analysen und Antikörpern, die nur das phosphorylierte CREB erkennen (als primärer Antikörper wurde der Kaninchen anti-Phospho-CREB-AK und als sekundärer Antikörper anti-Rabbit-AK eingesetzt), die Phosphorylierung von CREB in KB-Zellen (a) bei Wachstum der Zellen in 0.25% FCS und in 10% FCS, (b) in Ab- und Anwesenheit von exogen

exprimierter PKA-C $\alpha$ -Untereinheit und (c) in An- und Abwesenheit von 20 $\mu$ M Forskolin analysiert. Forskolin (aus der Wurzel des indischen Nesselgewächses *Coleus forskohlii*) aktiviert die Adenylatcyclase.

Überraschend war, dass das CREB-Protein (43kDa groß) bei 10% Serumkonzentration im Medium gleich stark phosphoryliert war, unabhängig davon, ob in den Zellen der cAMP/PKA-Signalweg durch die exogene Expression der PKA-C $\alpha$ -Untereinheit oder Forskolin stimuliert wurde oder nicht (siehe Abb. 13, A und Abb. 13, B). Dies legte die Vermutung nahe, dass in den Zellen ein hoher Basalspiegel von Phospho-CREB vorliegt.

Um einen möglichen Einfluss der Serumkonzentration auf den Basalspiegel von Phospho-CREB in der Zelle zu analysieren, wurden sowohl KB-Zellen, als auch COS7-Zellen 48 Stunden unter Serumentzug (0,25% FCS) und zum Vergleich für dieselbe Zeit mit 10% FCS kultiviert. Anschließend wurde der cAMP/PKA-Signalweg für 24 Stunden mit Forskolin stimuliert und der Phospho-CREB-Spiegel mit Antikörpern, die nur das am Ser-133 phosphorylierte CREB-Protein erkennen, in Western-Blot-Analysen bestimmt. Die Versuche mit KB-Zellen bestätigten den hohen Basalspiegel von Phospho-CREB in den Zellen, die in 10% FCS kultiviert worden waren (Abb. 13, C2). Wuchsen die KB-Zellen zuvor 48 Stunden bei 0,25% FCS, war nur wenig Phospho-CREB nachweisbar; nach anschließender Stimulierung des cAMP/PKA-Signalweges mit Forskolin oder der exogenen Expression von PKA-C $\alpha$ , nahm die Menge an Phospho-CREB deutlich zu (Abb. 13, C1). Um sicher zu gehen, dass die veränderten Versuchsbedingungen (0,25% FCS vor Stimulationsbeginn) zu einer erhöhten Phosphorylierung von CREB führen und um auszuschließen, dass sich diese Unterschiede auf das Auftragen unterschiedlicher Proteinmengen zurückführen lassen, wurde bei demselben Blot eine Immunreaktion mit dem Antikörper PKA-C $\alpha$ -c-21, der gegen die katalytische Untereinheit C $\alpha$  der Proteinkinase A gerichtet ist, durchgeführt (Abb. 13, D1

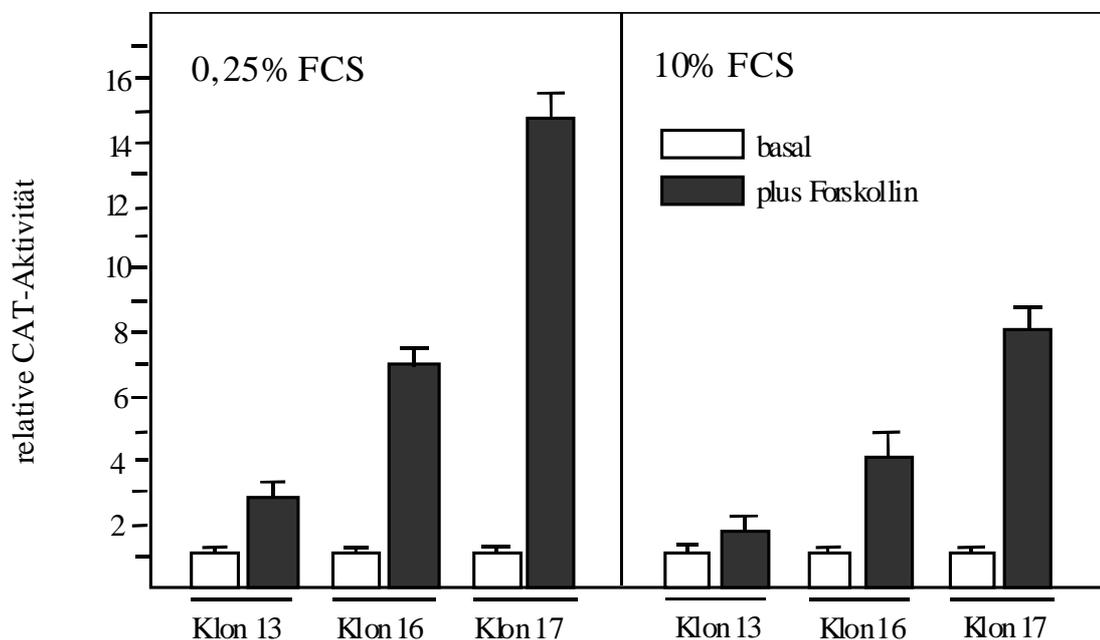
und D2). Wie die Abb. 13, D1 und D2 zeigen, wurden vergleichbare Proteinmengen auf die SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen.



**Abb. 13: Analysen des Phosphorylierungsstatus des Transkriptionsfaktors CREB/ATF-1 in KB- und Cos7-Zellen, die in Medium mit 0,25% bzw. 10% FCS in Abwesenheit und Gegenwart von Forskolin wuchsen. Die Phosphorylierung von CREB wurde nachgewiesen mit Hilfe von Western-Blot-Analysen und Antikörpern, die nur aktiviertes CREB erkennen, das am Serinrest-133 phosphoryliert ist. (A) und (B) zeigen die CREB-Phosphorylierung in KB-Zellen, die in 10% FCS wuchsen, (C1) und (C2) die CREB-Phosphorylierung in KB-Zellen, die zusätzlich in Abwesenheit und Gegenwart von 20 $\mu$ M Forskolin wuchsen. (D1) und (D2) zeigen die Immunpräzipitation der katalytischen PKA-Untereinheit C $\alpha$  als Kontrolle dafür, dass etwa gleiche Proteinmengen vor der Elektrophorese auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen wurden. (E1) und (E2) zeigen die Ergebnisse der Ser-133-Phosphorylierung von CREB in Cos7-Zellen, die unter gleichen Bedingungen wuchsen wie unter C1 und C2 beschrieben; in (F1) und (F2) ist, als Kontrolle der auf das Gel aufgetragenen Proteinmengen, wieder der immunologische Nachweis der PKA-C $\alpha$ -Untereinheit dargestellt.**

In Cos7-Zellen, die in Medium mit 10% FCS wuchsen, wurde im Gegensatz zu KB-Zellen nur wenig Phospho-CREB gefunden, sofern der cAMP/PKA-Signalweg nicht stimuliert wurde (Abb. 13, E1 und E2). Auch hier wurde gezeigt, dass vergleichbare Proteinmengen aufgetragen wurden (Abb. 13, F1 und F2).

Parallel zu den oben beschriebenen Experimenten zur Aktivierung von CREB durch Phosphorylierung des Ser-133, habe ich mit Hilfe der CAT-Assays die Aktivierbarkeit des kovalent integrierten E2<sub>Ad12</sub>-WT-Promotors in Gegenwart von Forskolin analysiert. Die Abb. 14 zeigt beispielhaft die Aktivierung der CAT-Expression für drei KB-Zellklone (Klon 13, Klon 16, Klon 17). Die Daten zeigen, dass sich die CAT-Expression dieser Zellklone nach Stimulierung des cAMP/PKA-Signalweges durch Forskolin um mehr als das Doppelte erhöht.



**Abb. 14: Aktivierung des E2<sub>Ad12</sub>-WT-Promotors im pBL-E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT-Reporterkonstrukt in den KB-Klonen 13, 16 und 17 durch Forskolin.** In Zellextrakten der KB-Zellklone 13, 16 und 17, die entweder in Medium mit 0,25% FCS oder 10% FCS wuchsen, wurde die Aktivität des E2<sub>Ad12</sub>-WT-Promotors, d.h. die CAT-Expression in Abwesenheit und Gegenwart von 20µM Forskolin durch CAT-Analysen gemessen.

---

Zumindest die Zelllinien der Klone 16 und 17 scheinen damit vielversprechend für weitere Untersuchungen der Regulation des in das Wirtsgenom integrierten E2<sub>Ad12</sub>-WT-Promotors zu sein.

Mit weiterführenden Experimenten mit diesen Zelllinien erhoffen wir uns sowohl neue Erkenntnisse über die Beteiligung des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges, als auch Hinweise über die Beteiligung von Chromatin-remodellierenden und -modifizierenden Faktoren an der Regulation viraler und zellulärer CREB-regulierter Promotoren zu gewinnen.

## 5. Diskussion

Im Verlauf des lytischen Entwicklungszyklus von Adenoviren sind die E1A-Proteine u.a. für die Aktivierung der adenoviralen Promotoren verantwortlich. Die E1A-vermittelte Aktivierung des E2-Promotors, der die Expression replikationsrelevanter Proteine reguliert, spielt hierbei eine zentrale Rolle bei der Vermehrung von Adenoviren. E1A-Proteine vermitteln die Aktivierung des viralen E2-Promotors, wie Herr Dr. Peter Fax am hiesigen Institut gezeigt hat, über einen Zwei-Stufen-Mechanismus. Im ersten Aktivierungsschritt bewirkt das E1A<sub>12S</sub>-Protein eine Translokation der zytoplasmatisch lokalisierten regulatorischen Untereinheit RII $\alpha$  des Holoenzym der Proteinkinase A in den Zellkern. Im zweiten Aktivierungsschritt ist das E1A-Protein an der Bildung eines transkriptionell aktiven Multifaktorkomplexes auf dem CRE-Element des E2-Promotors beteiligt. Die durch das E1A<sub>12S</sub>-Protein an den Promotor rekrutierte RII $\alpha$ -Untereinheit dient als Adapter für die katalytische C $\alpha$ -Untereinheit, die hierdurch die Phosphotransferase-Aktivität der PKA an den Promotor bindet. Die C $\alpha$ -Untereinheit-induzierte Phosphorylierung und die damit verbundene Aktivierung, z. B. der Koaktivatoren p300/CBP, ist das entscheidende zweite Aktivierungssignal für die Transkription vom E2<sub>Ad12</sub>-Promotor durch das E1A<sub>12S</sub>-Protein.

Weitere Untersuchungen durch Frau Dr. Rozita Hashemi am Institut für Molekularbiologie zeigten, dass ein dritter Aktivierungsschritt zur kompletten Aktivierung des E2-Promotors notwendig ist, nämlich die physikalische und funktionelle Interaktion des promotorgebundenen Multifaktorkomplexes (CREB/p300/E1A) mit Komponenten des Chromatin-remodellierenden Komplexes SWI/SNF. Dabei scheinen die adenoviralen E1A-

Proteine, die in der Lage sind, die ATPase-Aktivität exprimierende Untereinheit BRG-1 des SWI/SNF-Komplexes zu binden, eine wichtige Rolle zu spielen.

Transfizierte Vektor-DNA wird, nachdem sie in den Kern transportiert wurde, durch Bindung von Histonproteinen in Chromatin-ähnliche Strukturen verpackt, die jedoch nur annähernd den Chromatinstrukturen des Wirtsgenoms entsprechen. Um die Aktivierung von, ins Wirtsgenom integrierten, Genen durch den cAMP/PKA-Signalweg, durch Funktionen Chromatin-remodellierender Komplexe (z.B. des SWI/SNF-Komplexes) und die E1A-Proteine genauer zu studieren, sollten humane Zelllinien etabliert werden, die einen geeigneten Expressionsvektor enthalten, der kovalent in die Wirts-DNA integriert vorliegt. Der Expressionsvektor sollte den Ad12-spezifischen E2-Promotor enthalten, der ein CRE-Element trägt und über CREB, p300 und E1A durch den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg und Funktionen des SWI/SNF-Komplexes aktiviert wird. Als Reportergen waren das lacZ- und das Chloramphenicolacetyl-Transferase-Gen vorgesehen.

### ***5.1 Effizienz des Nachweises der E2<sub>Ad12</sub>-Promotoraktivierung durch E1A und PKA-C $\alpha$ bei Verwendung unterschiedlicher Reportergenkonstrukte.***

Das Prinzip des Nachweises der Aktivierung des E2-Promotors im Expressionsvektor E2<sub>Ad12</sub>-WT/pBlue-TOPO besteht darin, dass die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase (Reportergenprodukt), nach Aktivierung des E2-Promotors, durch die Hydrolyse des  $\beta$ -Galaktosids X-gal gemessen wird; letzteres führt zu einer Blaufärbung der Zellen. Auch unter optimalen Versuchsbedingungen war es mir, unter Verwendung des Quality Control  $\beta$ -Gal Staining Kits (Invitrogen) nicht möglich, bei der Aktivierung des E2-Promotors durch gleichzeitige Expression des E1A<sub>12S</sub>-Proteins oder der PKA-C $\alpha$ -Untereinheit eine deutliche Blaufärbung

der KB-Zellen zu erreichen. KB-Zellen, die entweder einen von Invitrogen mitgelieferten Kontrollvektor (Positivkontrolle, pcDNA3.1/His/lacZ) oder anstelle des E2-Promotors einen CMV-Promotor im pBlue-TOPO-Vektor enthielten, zeigten eine mehr als 15-20fach stärkere Anfärbung.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass entweder die Aktivierung des E2<sub>Ad12</sub>-Promotors zu gering oder der Nachweis der exprimierten  $\beta$ -Galaktosidase durch die Hydrolyse des  $\beta$ -Galaktosids X-gal nicht ausreichend effektiv war. Hierfür könnte es folgende Erklärungsmöglichkeit geben: Bei dem E2<sub>Ad12</sub>-WT-Promotor handelt es sich um einen eher schwachen Promotor. Das erklärt auch, warum bei dem Reporterkonstrukt mit dem CMV-Promotor, der zu der Gruppe der sehr starken Promotoren gehört, ohne Probleme die  $\beta$ -Galaktosidase-Expression nachgewiesen werden konnte. Anscheinend ist, zumindest in dem von mir verwendeten Zellsystem, das Nachweisverfahren der Expression der  $\beta$ -Galaktosidase nicht sensitiv genug, um die Aktivierung des E2<sub>Ad12</sub>-WT-Promotors durch E1A-Proteine bzw. den cAMP/PKA-Signalweg eindeutig zu bestimmen. Auch muss dabei berücksichtigt werden, dass bei der Transfektion (bzw. Elektroporation) der Zellen mit den entsprechenden Expressions- und Reporterkonstrukten maximal nur 30 bis 40% der transfizierten Zellen überhaupt die Plasmide erhalten haben.

Um die Aktivität eines schwächeren Promotors, wie die des E2<sub>Ad12</sub>-Promotors, dennoch nachweisen zu können, habe ich ein noch sensitiveres Nachweisverfahren, den sog. CAT-Assay eingesetzt. In ihm wird die Expression des Reporterproduktes, des Enzyms Chloramphenicolacetyl-Transferase (CAT), durch die Überführung von <sup>14</sup>C-markiertem Chloramphenicol in seine acetylierten Formen in Zellextrakten gemessen, wobei Acetyl-Coenzym A als Donor für die Acetyl-Gruppen dient. Der Vorteil des Reporterproduktes

Chloramphenicolacetyl-Transferase besteht darin, dass durch ihre hohe Enzymaktivität schon geringere Mengen des CAT-Enzyms ausreichen, um mit dem CAT-Assay nachgewiesen zu werden. Wie sich zeigte, waren die CAT-Analysen ausreichend sensitiv, um auch kleinere Veränderungen der Aktivität des E2<sub>Ad12</sub>-Promotors zu detektieren.

### ***5.2 Etablierung von Zelllinien mit kovalent in das Wirtsgenom integriertem E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT-Promotor***

Zur Etablierung der Zelllinien wurde bei der Transfektion der Zielzellen mit dem Promotor/Reporter-Konstrukt pBL-E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT und dem Selektionsplasmid pBabe-Puro ein Vektor-DNA-Mengenverhältnis von 15:1 gewählt. Damit sollte erreicht werden, dass nahezu alle transfizierten KB- oder Hela<sup>tk</sup>-Zellen, die eine Resistenz gegenüber Puromycin zeigen, auch das Reporterkonstrukt pBL-E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT besitzen. Dieses Verhältnis erwies sich nach PCR-Analysen als gut gewählt, da von 16 getesteten Puromycin-resistenten Klonen 15 laut PCR-Screening eine Integration des E2<sub>Ad12</sub>-CAT-Reporterkonstrukts in das Wirtsgenom aufwiesen.

### ***5.3 Warum lässt sich der E2-Promotor im kovalent integrierten E2<sub>Ad12</sub>-CAT-Reporterkonstrukt in den verschiedenen Zellklonen unterschiedlich gut induzieren?***

Die Induzierbarkeit der Zellklone ist abhängig von dem Ort der Integration des Promotor/Reporter-Konstrukts in die zelluläre DNA. Da der Ort der Integration des Konstrukts in die Wirts-DNA weitgehend zufällig erfolgt, kann die Integration in transkriptionell aktive oder weniger aktive Genomregionen geschehen. Findet diese

Integration zufällig in einer transkriptionell besonders aktiven Region statt, kann man mit einer erhöhten Promotoraktivität und als Folge mit einer höheren Expressionsrate des Reportergens rechnen. Dieser Vorgang ist eine mögliche Erklärung dafür, warum das lacZ-Gen in den Zellklonen 16 und 17 gut exprimiert wird. Wahrscheinlich hat bei den anderen Zellklonen die Integration des Reporterkonstrukts an einer transkriptionell nicht sehr aktiven Region im Wirtsgenom stattgefunden.

Inzwischen ist in nachfolgenden Studien gezeigt worden, dass das E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT-Reporterkonstrukt von dem Klon E17 auch durch E1A-Proteine aktiviert werden kann. Außerdem ließ sich eine Aktivierungszunahme nachweisen, wenn der cAMP-Signalweg zusätzlich eingeschaltet wurde. Diese Ergebnisse entsprechen damit den transienten Expressionsergebnissen.

Mit den von mir so etablierten Zellklonen 16 und 17 erhoffen wir uns sowohl neue Erkenntnisse über die Beteiligung des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges, als auch Hinweise über die Beteiligung von Chromatin-remodellierenden und -modifizierenden Faktoren an der Regulation viraler und zellulärer CREB-regulierter Promotoren.

## 6. Zusammenfassung

Die zu Beginn meiner Dissertation vorliegenden Ergebnisse über die Modulation des zyklischen Adenosin-5'-Monophosphat (cAMP)/Proteinkinase A (PKA)-abhängigen Signaltransduktionsweges durch das E1A<sub>12S</sub>-Onkoprotein des Adenovirus Typ12 (Ad12) wurden ausschließlich durch transiente Expressionsassays mit dem Ad12-spezifischen early region 2 (E2)-Promotor durchgeführt, der aufgrund eines cAMP response element (CRE) über die Transkriptionsfaktoren CRE-binding protein (CREB)/CREB-binding protein (CBP) und den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg reguliert wird. Transfizierte Vektor-Desoxyribonukleinsäure (DNA) wird nur in eine Chromatin-ähnliche Strukturen verpackt, gerade die Chromatinstruktur und die Chromatin-regulierenden Faktoren sind jedoch entscheidend für die Tumorigenese und damit auch für die Krebstherapie. Viele Einzelheiten der Regulationsmechanismen sind noch unerforscht, deshalb sollte ich eine humane Zelllinie etablieren, deren kovalent integrierter Expressionsvektor den Ad12-spezifischen E2-Promotor und ein Reporter gen enthalten sollte. Hierzu wurden von mir in zwei verschiedene Typen von Expressionsvektoren (pBlue-TOPO, pBL-CAT) mit unterschiedlichen Reporter genen ( $\beta$ -Galactosidase-Gen=lacZ-Gen, Chloramphenicolacetyl-Transferase-Gen=CAT-Gen) der E2<sub>Ad12</sub>-Wildtyp (WT)-Promotor und verschiedene Promotormutanten kloniert. Da der Nachweis des Reporter genprodukts  $\beta$ -Galactosidase nach Aktivierung des Promotors durch E1A-Proteine und die PKA-C $\alpha$ -Untereinheit in den Zellen schwierig war, wurde zur Etablierung der Zelllinien mit integriertem Expressionsvektor das pBL-CAT-Vektorsystem benutzt. Nach Kotransfektion von KB-Zellen mit dem Expressionsplasmid pBL-E2<sub>Ad12</sub>-WT/CAT und pBabe-Puro, einem Expressionsplasmid, das den Selektionsmarker Puromycin exprimiert, wurden von mir mit Hilfe der Polymerase Chain Reaction (PCR) 15 Puromycin-resistente Zellklone mit kovalent integriertem Expressionsplasmid identifiziert. Bei zwei dieser KB-Zellklone (Klon 16 und 17) ließ sich der in das Wirtsgenom integrierte E2<sub>Ad12</sub>-WT/Promotor durch das E1A<sub>12S</sub>-Protein und die PKA-C $\alpha$ -Untereinheit gut aktivieren. Parallele Versuche zeigten, dass es aufgrund eines hohen Basalspiegels von Phospho-CREB in den Zellen günstig war, den E2<sub>Ad12</sub>-Promotor durch Forskolin über den cAMP/PKA-Signalweg erst nach Haltung im Hungermedium zu stimulieren. Unter diesen Bedingungen erhöhte sich die CAT-Expression der Zellklone 16 und 17 um mehr als das Doppelte, was diese Klone für weitere Untersuchungen der Regulation des in das Wirtsgenom integrierten E2<sub>Ad12</sub>-WT-Promotors durch den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg und durch Chromatin-remodellierende und -modifizierenden Faktoren als geeignet erscheinen lässt.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R., et al., eds. (1997):  
Current protocols in molecular biology.  
New York: Wiley.
2. Arany, Z., Newsome, D., Oldread, E., Livingston D. M. und Eckner, R. (1995):  
A family of transcriptional adaptor proteins targeted by the E1A oncoprotein.  
Nature 374: 81-84.
3. Bachenheimer, S. und Darnell, JE (1975):  
Adenovirus-2 mRNA is transcribed as part of a high-molecular-weight precursor RNA.  
Proc Natl Acad Sci USA 72(11): 4445-9.
4. Bailey A. und Mautner V. (1994):  
Phylogenetic relationships among adenovirus serotypes.  
Virology 205: 438-452.
5. Berger S. L. (2002):  
Histone modifications in transcriptional regulation.  
Curr Opin Genet Dev. 12: 142-8.
6. Berget, SM, Moore, C. und Sharp, PA (1977):  
Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA.  
Proc Natl Acad Sci USA 74(8): 3171-5.
7. Berk A. J. (1986):  
Adenovirus promoters and E1A transactivation.  
Ann. Rev. Genet. 20: 45-79.
8. Berk A. J., Boyer T. G., Kapanidis A. N., Ebright R. H., Kobayashi N. N., Horn P. J.,  
Sullivan S. M., Koop R., Surby M. A. und Triezenberg S. J. (1998):  
Mechanisms of viral activators.  
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42: 243-252.

9. Bernards R., Schrier P. I., Houweling A., Bos J. L., van der Eb A. J., Zylstra M. und Melief C. J. M. (1983):  
Tumorigenicity of cells transformed by adenovirus type 12 by evasion of T-cell immunity.  
*Nature* 305: 776-797.
10. Birnboim H.C., Doly J. A. (1979):  
Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.  
*Nucleic Acids Res.* 7: 1513-23.
11. Bradford M. M. (1976):  
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.  
*Anal. Biochem.* 72: 248-254.
12. Brockmann D. und Esche H. (1995):  
Regulation of viral and cellular gene expression by E1A proteins encoded by the oncogenic adenovirus type 12.  
*Curr Top Microbiol Immunol.* 199:81-112.
13. Brockmann, D., Schäfer, D., Kirch, H.-C. und Esche, H. (1996):  
Repression of the c-Jun-induced mouse major histocompatibility class I promoter (H-2K<sup>b</sup>) activity by the adenovirus type 12-unique 52R E1A protein.  
*Oncogene* 12: 1715-1725.
14. Brockmann D., Tries B. und Esche H. (1990):  
Isolation and characterisation of novel adenovirus type 12 E1A mRNAs by cDNA cloning.  
*Virology* 179: 585-590.
15. Brockmann D., Fax P., Hashemi R., Kullmann S., Lehmkuhler O., Nolte C. und Esche, H. (2001):  
Adenovirus E1A: a functional link between transcription factors and co-activators.  
*Recent Res. Devel. Virol.* 3: 277-295.

16. Doerfler W. (1969):  
Nonproductive infection of baby hamster kidney cells (BHK21) with adenovirus type 12.  
*Virology* 38: 587-606.
17. Duyndam M., van Dam H., van der Eb A. und Zantema A. (1996):  
The CR1 and CR3 domains of Adenovirus Type 5 E1A proteins can independently mediate activation of ATF-2 J.  
*Virol.* 70: 5852-5859.
18. Esche, H., Schilling, R. und Doerfler, W. (1979):  
In vitro translation of adenovirus type 12 specific mRNA isolated from infected and transformed cells.  
*J. Virol.* 30: 21-31.
19. Esche H. und Siegmann B. (1982):  
Expression of early viral gene products in adenovirus type 12 infected and transformed cells.  
*J. Virol.* 60: 99-113.
20. Evans, R. M., Fraser, N., Ziff. E., Weber, J., Wilson, M. und Darnell, J. E. (1977):  
The initiator sites for RNA transcription in Ad2 DANN.  
*Cell* 12: 733-739.
21. Fax P., Carlson C. R., Collas P., Tasken K., Esche H. und Brockmann D. (2001):  
Binding of PKA-RIIalpha to the Adenovirus E1A<sub>12S</sub> oncoprotein correlates with its nuclear translocation and an increase in PKA-dependent promoter activity.  
*Virology* 285: 30-41.
22. Fax P., Lehmkuhler O., Kuhn C., Esche H. und Brockmann D. (2000):  
E1A<sub>12S</sub>-mediated activation of the adenovirus type 12 E2 promoter depends on the histone acetyltransferase activity of p300/CBP.  
*J. Biol. Chem.* 275: 40554-40560.

23. Fax P., Lipinski, K. S., Esche H. undj Brockmann D. (2000):  
cAMP-independent activation of the Adenovirus type 12 E2 promoter correlates with the recruitment of CREB-1/ATF-1, E1A<sub>12S</sub>, and CBP to the E2-CRE.  
J. Biol. Chem. 275: 8911-8920.
24. Felgner, P. und Ringold, G. (1989):  
Cationic liposome-mediated transfection.  
Nature 337: 387.
25. Ferguson B., Kripple B., Andrisani O., Jones N., Westphal H. und Rosenberg M. (1985):  
E1A 13S and 12S mRNA products made in Escherischia coli both function as nucleus-localized transcription activators but do not directly bind DNA.  
Mol. Cell. Biol. 5: 2653-2661.
26. Flint J. und Broker T. R. (1981):  
Lytic infection by adenoviruses.  
In: Molecular Biology of Tumor Viruses (Tooze, J., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 443-547.
27. Gariglio P., Llopis R., Oudet P. und Chambon P. (1979):  
The template of the isolated native simian virus 40 transcriptional complexes is a minichromosom.  
J. Mol. Biol. 131: 75-105.
28. Gedrich, R. W. und Engel, D. A. (1995):  
Identification of a novel E1A response element in the mouse c-fos promoter.  
J. Virol. 69: 2333-2340.
29. Grunstein M. (1998):  
Yeast heterochromatin: regulation of its assembly and inheritance by histones.  
Cell 93: 325-8.

30. Gu W., Shi X. L. und Roeder R. G. (1997):  
Synergistic activation of transcription by CBP and p53.  
Nature 387: 819-823.
31. Hagiwara M., Brindle P., Harootunian A., Armstrong R., Rivier J., Vale W., Tsien R.  
und Montminy M. R. (1993):  
Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor  
CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A.  
Mol. Cell. Biol. 13: 4852-4859.
32. Hanahan, D. (1985):  
Techniques for transformation of Escheria coli.  
DNA cloning, Vol. 1 (Glover, D. M., ed.): 109-135.
33. Harlow E. und Lane D. (1988):  
Antibodies, A Laboratory Manual.  
CSH Laboratory Press, CSH, New York, USA.
34. Horwitz M. S., Scharff M. D. und Maizel J. V. (1969):  
Synthesis and assembly of adenovirus 2. I. Polypeptide synthesis, assembly of capsomeres  
and morphogenesis of the virion.  
Virology 39: 682-684.
35. Horwitz, M. S. (1990):  
Adenovirus.  
Virology (Fields, B. N. & Knipe, D.M., eds), Raven Press, New York: 1723-1740.
36. Horwitz, M. S., Tufariello, J., Grunhaus und Fejer, G. (1995):  
Model systems for studying the effects of adenovirus E3 genes on virulence in vivo.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 199/III: 195-213.

37. Hu, S. C., Chrivia, J. und Ghosh, A. (1999):  
Regulation of CBP-mediated transcription by neuronal calcium signaling.  
*Neuron* 22: 799-808.
38. Ikeda M. A. und Nevins J. R. (1993):  
Identification of distinct roles for separate E1A domains in disruption of E2F complexes.  
*Mol. Cell. Biol.* 13: 7029-7035.
39. Janknecht R. und Hunter T. (1996):  
A growing coactivator network.  
*Nature* 383: 22-23.
40. Kimelmann D., Miller J., Porter D. und Roberts B. (1985):  
E1A regions of human adenoviruses and the highly oncogenic simian virus 7 are closely related.  
*J. Virol.* 53: 399-409.
41. Kingston R. E. und Narlikar G. J. (1999):  
ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity.  
*Genes Dev.* 13: 2339-2352.
42. Kornberg R. D. und Lorch Y. (1999):  
Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryotic chromosome.  
*Cell* 98: 285-294.
43. Korzus E., Torchia J., Rose D. W., Xu L., Kurokawa R., McInerney E. M., Mullen T. M., Glass C. K. und Rosenfeld M. G. (1998):  
Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase function.  
*Science* 279: 703-707.

44. Kovar, H. (1999):  
E1A and the Ewing tumor translocation.  
Nat. Med. 5: 1331.
45. Koveschdie, I., Reichel, R. und Nevins, J. R. (1986):  
Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation.  
Cell 45: 219-228.
46. Laemmli U. (1970):  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
Nature 227: 680-685.
47. Lee B. H. und Mathews M. B. (1997):  
transcriptional coactivator cAMP response element binding protein mediates induction of  
the human proliferating cell nuclear antigen promoter by the adenovirus E1A oncoprotein.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4481-4486.
48. Lill N., Grossmann S. R., Ginsberg D., DeCaprio J. und Livingston D. M. (1997):  
Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators.  
Nature 387: 823-827.
49. Lipinski KS, Esche H, Brockmann D. (1998):  
Amino acids 1-29 of the adenovirus serotypes 12 and 2 E1A proteins interact with rap30  
(TF(II)F) and TBP in vitro.  
Virus Res. 54:99-106.
50. Lipinski, KS., Fax, P., Wilker, B., Hennemann; H., Brockmann, D., Esche, H. (1999)  
Differences in the interactions of oncogenic adenovirus 12 early region 1A and  
nononcogenic adenovirus 2 early region 1A with the cellular coactivators p300 and CBP.  
Virology 255(1): 94-105.

51. Liu F. und Green M. R. (1990):

A specific member of the ATF transcription factor family can mediate transcription activation by the adenovirus E1A Protein.

Cell 61: 1217-1224.

52. Lundblad, J. R., Kwok, R. P., Laurance, M. E., Harter, M. L. und Goodman, R. H. (1995):

Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP.

Nature 374: 85-88.

53. Melkonyan, H., Sorg, C. und Klempt, M. (1996):

Electroporation efficiency in mammalian cells is increased by dimethyl sulfoxide (DMSO).

Nucleic Acids Res. 18: 4356-4357.

54. Melot, T. und Delattre (1999):

E1A and the Ewing tumor translocation.

Nat. Med. 5:1331

55. Mermelstein F, Yeung K, Cao J, Inostroza JA, Erdjument-Bromage H, Egelson K, Landsman D, Levitt P, Tempst P, Reinberg D. (1996):

Requirement of a corepressor for Dr1-mediated repression of transcription.

Genes Dev. 10: 1033-48.

56. Momparler, R. L. (2003):

Cancer epigenetics.

Oncogene 22: 6479-6483

57. Mullis, K., Falcoona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Ehrlich, H. (1986):

Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction.

Quant. Biol. 51: 263.

58. Nevins, J. und Darnell, J. E. (1978):

Groups of adenovirus type 2 mRNAs derived from large primary transcript: probably nuclear origin and possible common 3'-ends.

J. Virol. 25: 811-823.

59. Norrby E., Bartha A. und Boulanger P. (1976):

Adenoviridae.

Intervirology 7: 117-125.

60. Peterson C. L. (2000):

ATP-dependent chromatin remodeling: going mobile.

FEBS Lett. 476: 68-72.

61. Philipson L. (1983):

Structure and assembly of adenoviruses.

Curr. Top. Microbiol. Immunol. 109: 1-53.

62. Pilder, S., Moore, M., Logan, J. und Shenk, T. (1986):

The adenovirus E1B-55K transforming polypeptid modulates transport or cytoplasmatic stabilisation of viral and host cell mRNAs.

Mol. Cell. Biol. 6: 470-476.

63. Reid J. L., Banister A. J., Zegerman P., Martinez-Balbas M. A. und Kouzarides T. (1998):

E1A directly binds and regulates the P/CAF acetyltransferase.

EMBO J. 17: 4469-447.

64. Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gallimore, L. K., Parrott, R. H. und Ward, T. G. (1953):

Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture.

Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 84:570-573.

65. Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989):  
Moleculare cloning: a laboratory manual, second edition.  
Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
66. Sanchez-Prieto, R., de Alava. E., Palomino, T., Guinea, J., Fernandez, B., Cebrian, S., Leonart, M., Cabello, P., Martin., P., San Roman, C., Bornstein, R., Pardo, J., Martinez, A., Diaz-Espada, F., Barrios, Y. und Ramon y Cajal, S. (1999):  
An association between viral genes and human oncogenic alterations: the adenovirus E1A induces the Ewing tumor fusion transcript EWS-FLII.  
Nat. Med. 5: 1076-1079.
67. Sassone-Corsi, P. (1988):  
Cyclic AMP induction of early adenovirus promoters involves sequences required for E1A transactivation.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7192-7196.
68. Shenk, T. (1996):  
Adenoviridae: the viruses and their replication.  
In: Fundamental Virology, Third Edition, (Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. et al., eds.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA.
69. Sprengel, J., Schmitz, B., Heuss-Neitzel, D., Zock, C. und Doerfler, W.(1994):  
Nucleotide sequenz of human Adenovirus Type 12 DNA: comparative functional analysis.  
J. Virol. 68: 379-389.
70. Strahl B. D., Allis C. D. (2000):  
The language of covalent histone modifications.  
Nature 403: 41-45.
71. Swaminathan S. und Thimmapaya B. (1995):  
Regulation of adenovirud E2 transcription unit.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 199/III: 177-194.

72. Tan, T-H., Jia, R. und Roeder, R. G. (1989):  
Utilization of signal transduction pathway by human T-cell leukaemia virus type 1 transcriptional activator tax.  
J. Virol. 63: 3761-3768.
73. Trouche D. und Kouzarides T (1996):  
E2F1 and E1A<sub>125</sub> have a homologous activation domain regulated by RB and CBP.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1439-1442.
74. van der Eb A. J. und Bernards R. (1984):  
Transformation and oncogenicity by adenoviruses.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 110: 23-51.
75. van der Eb, A. J., Mulder, C., Graham, F. L. und Houweling, A. (1977):  
Transformation with specific fragments with transforming activity of adenovirus 2 and 5 DNA.  
Gene 2: 115-132.
76. Wadell G. (1984):  
Molecular epidemiology of adenovirus.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 110: 191-220.
77. Weintraub S. J, Prater C. A. und Dean D. C. (1992):  
Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element.  
Nature 358: 259-61.
78. Whyte, P., Ruley, H. E. und Harlow, E. (1988):  
Two regions of the adenovirus early region 1A are required for transformation.  
J. Virol. 62: 257-265.
79. Williams J., Williams M., Liu C. und Telling G. (1995):  
Assessing the role of E1A in the differential oncogenicity of group A and group C human adenoviruses.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 199/III, 149-177.

80. Wolffe A. P. (2001):

Chromatin remodeling: why it is important in cancer.

Oncogene 20: 2988-2990

81. Wolffe A. P. (1995):

Centromeric chromatin. Histone deviants.

Curr Biol. 5: 452-454.

82. Yuan W., Condorelli G., Caruso M., Felsani A. und Giordano A. (1996):

Human p300 protein is a coactivator for the transcription factor MyoD.

J. Biol. Chem. 271: 9009-9013.

83. Zhang H. S., und Dean, D. C. (2001):

Rb-mediated structure regulation and transcriptional repression.

Oncogene 20: 3134-3138.

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Ampere
Abb.	Abbildung
A. bidest	Zweifach destilliertes, entmineralisiertes Wasser
As	Aminosäure
Ad	Adenovirus
AK	Antikörper
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinder Serum Albumin)
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosin-5'-Monophosphat
CAT	Chloramphenicolacetyl-Transferase
CR	Conserved Regions (konservierte Regionen der E1A-Region der Adenoviren)
Da	Dalton (atomare Masseneinheit; 1 Dalton = $1,66 \times 10^{-24}$ g)
DATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
DGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modifikation von Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol

---

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
°C	Grad Celsius
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
hnRNA	heterogeneous nuclear RNA (heterogene Kern-RNA)
HPV	Human Papilloma Virus (humanes Papillomavirus)
IgG	Immunglobulin G
kbp	Kilobasenpaare
kDA	Kilo-Dalton
l	Liter
LB	Luria-Bertania
M	Molarität (mol/l)
mol	Mol (Stoffmenge)
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
nt	Nukleotid
o.	oben
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-Buffered-Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
pH	pH-Wert ( $\text{pH} = -\log_{10}[\text{Protonenkonzentration (mol/l)}]$ )
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute

RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl-Sulfate
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Na-acetat/EDTA-Puffer
TBS	Tris-Buffered-Saline (trisgepufferte Salzlösung)
tk <sup>-</sup>	Thymidin-Kinase negative Zellen
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit (Enzym-Aktivitätseinheit; 1U = 1mol/min)
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
VT	Versen-Trypsin
z. B.	zum Beispiel
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung g (1 xg = 9,81m/s <sup>2</sup> )

Folgend sind die in dieser Arbeit benutzten Präfixe aufgeführt, die zur Angabe der Zehnerpotenz jeweils mit der Maßeinheit zu multiplizieren sind.

k	Kilo	= 10 <sup>3</sup>
c	Zenti	= 10 <sup>-2</sup>
m	Milli	= 10 <sup>-3</sup>
μ	Mikro	= 10 <sup>-6</sup>
n	Nano	= 10 <sup>-9</sup>
p	Pico	= 10 <sup>-12</sup>

## **Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Esche für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut anfertigen zu können. Außerdem möchte ich ihm für seine hervorragende Betreuung und immerwährende Unterstützung während meiner Promotionszeit danken.

Herrn Priv. Doz. Dr. D. Brockmann und Herrn Dr. P. Fax danke ich herzlich für die hilfreichen Diskussionen und die vielfältigen Anregungen, die zum Fortgang dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz lieben Dank gebührt allen ehemaligen und rezenten Laborkollegen für die entspannte Arbeitsatmosphäre und die hervorragende Zusammenarbeit. Ganz besonders danken möchte ich an dieser Stelle meiner Kollegin Frau Dr. R. Hashemi für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Frau Ulla Schmücker danke ich für ihre hervorragende technische Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente. Ihr und Frau Claudine Kühn möchte ich für die unermüdliche Unterstützung im Laboralltag mit Tipps und Tricks danken.

Im Besonderen danke ich meinen Eltern für die immerwährende Unterstützung, ohne die es mir nicht möglich gewesen wäre, Medizin zu studieren. Besonders danke ich auch Andreas, ohne dessen Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit danke ich der DFG und dem IFORES.

## Curriculum Vitae

Name	<b>Christiane Nolte</b>
Geboren	04.01.1975 in Bochum
Wohnort	Bochum
	<b>Schullaufbahn</b>
1981 – 1985	St. Barbara-Grundschule, Bochum
1985 – 1994	Hildegardis-Gymnasium, Bochum
	<b>Studium</b>
Okt. 1994- April 1997	Humanmedizin, Ruhr-Universität-Bochum
April 1997- Nov. 2001	Humanmedizin, Universität-Gesamthochschule–Essen
	<b>Promotion</b>
Ab April 2000	Beginn der Promotion mit der Durchführung des experimentellen Teils im Institut für Molekularbiologie bei Prof. Esche, Universitätsklinikum Essen
	<b>Praktisches Jahr</b>
Okt. 2000 – Sept. 2001	Elisabeth-Krankenhaus Essen Wahlfach: Anästhesie
	<b>Ärztin im Praktikum</b>
01.01.2002 – 30.06.2003	Elisabeth-Krankenhaus Essen Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie
	<b>Assistenzärztin</b>
01.07.2003 – 31.07.2003	Elisabeth-Krankenhaus Essen Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie
Seit 01.01.2004	Knappschaftskrankenhaus Recklinghausen Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin