

Institut für Molekularbiologie
(Tumorforschung)

**Der Adenovirus-Typ 12 E2-Promotor:
Ein Modell zur Untersuchung der Modulation des
cAMP/PKA-abhängigen Signaltransduktionswegs
durch das Ad12 E1A_{12S}-Onkoprotein**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
des Fachbereichs
Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur
an der
Universität-Gesamthochule Essen

vorgelegt von

Peter Fax
aus Essen

Juni 2000

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung) der Universität-Gesamthochschule Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Esche

2. Gutachter: Prof. Jakobs

3. Gutachter: Prof. Hensel

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Ryffel

Tag der mündlichen Prüfung: 18.10.2000

Inhaltsübersicht

<i>Ausführliches Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>V</i>
1. Einleitung	1
2. Material	17
3. Methoden	34
4. Ergebnisse	46
5. Diskussion	86
6. Zusammenfassung und Ausblick	98
7. Literaturverzeichnis	100
8. Eigene Publikationen	113
9. Lebenslauf	114
10. Erklärungen	115

Inhaltsverzeichnis

<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	V
1. Einleitung	1
1.1 Adenoviren	1
1.1.1 Die produktive Infektion	2
1.1.2 Die abortive Infektion	4
1.2 Struktur und Proteine der E1A-Region des onkogenen Serotyps Ad12	4
1.3 Kontrolle der Genexpression durch die E1A-Proteine: Aktivierung und Repression	6
1.4 Interaktion der zellulären Koaktivatoren p300/CBP mit den E1A-Proteinen	8
1.4.1 Die Koaktivatorfunktionen von p300/CBP	9
1.4.2 Modulation der Koaktivatorfunktionen von p300/CBP durch die E1A-Proteine	11
1.4.2.1 Repression der Koaktivatorfunktionen von p300/CBP durch die E1A-Proteine	11
1.4.2.2 Aktivierung der Koaktivatorfunktionen von p300/CBP durch die E1A-Proteine	12
1.5 Koaktivatoren als Schaltstellen der E1A-vermittelten Modulation zellulärer Signaltransduktionswege: der cAMP/PKA-abhängige Signalweg	13
1.5.1 Regulation des cAMP/PKA-Signaltransduktionswegs durch die E1A-Proteine: Repression und Aktivierung	14
1.6 Zielsetzung	16
2. Material	17
2.1 Chemikalien	17
2.2 Enzyme	18
2.3 Peptide und Proteine	18
2.4 Antikörper	19
2.5 Nukleinsäuren	20
2.6 Medien, Seren, Transfektionsreagenzien und Zellkulturplatten	20
2.7 Radioaktive Substanzen	21
2.8 Molekulargewichtstandards	21
2.9 Kits	21
2.10 Filme, Filter, Membranen und besondere Verbrauchsmaterialien	22
2.11 Spezielle Laborgeräte	22
2.12 Puffer und Lösungen	23
2.13 Bakterienstämme	27
2.14 Hefen	28
2.15 Zelllinien	28

2.16	Expressionsplasmide _____	28
2.17	Zur Verfügung gestellte Plasmide _____	29
2.18	Oligonukleotide _____	32
3.	Methoden _____	34
3.1	Allgemeine Methoden _____	34
3.2	Zellkultur _____	34
3.3	Transfektion eukaryontischer Zellen _____	35
3.3.1	Lipofektion _____	35
3.3.2	Elektroporation _____	35
3.4	Bestimmung der CAT-Aktivität in Zellextrakten _____	35
3.5	Präparation von Cytoplasma- und Kernextrakten _____	36
3.6	Protein-Protein-Interaktionsanalysen _____	36
3.6.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese _____	36
3.6.2	Aufreinigung des HIS ₆ -E1A _{12S} -Proteins über Ni-NTA-Metall-Affinitäts- chromatographie _____	37
3.6.2.1	Aufreinigung des HIS ₆ -E1A _{12S} -Proteins unter denaturierenden Bedingungen ____	37
3.6.2.2	Renaturierung des HIS ₆ -E1A _{12S} -Proteins _____	37
3.6.3	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen _____	38
3.6.4	GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen _____	39
3.6.5	Western-Blot _____	39
3.6.6	Immunpräzipitationen _____	40
3.6.7	Immunfluoreszenz-Untersuchungen _____	40
3.6.8	Protein-Protein-Interaktionsstudien mittels des SOS-„Two-Hybrid“-Systems ____	41
3.6.8.1	Herstellung kompetenter <i>cdc25-2</i> -Hefen _____	41
3.6.8.2	Transformation kompetenter <i>cdc25-2</i> -Hefen _____	41
3.6.8.3	Selektive Wachstumsbedingungen zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen im SOS-„Two-Hybrid“-System _____	41
3.6.9	Histonacetyltransferase-Analysen (Brownell und Allis, 1995) _____	42
3.6.9.1	HAT-Analysen mit rekombinanten Proteinen _____	42
3.6.9.2	Kombinierte GST-Fusionsprotein-Interaktions-/HAT-Analysen _____	42
3.6.9.3	Kombinierte Immunpräzipitations-/HAT-Analysen _____	43
3.6.9.4	HAT-Analysen _____	43
3.6.9.5	Qualitative HAT-Analysen _____	43
3.7	DNA-Protein-Interaktionsanalysen _____	43
3.7.1	Gelretardationsanalysen _____	43
3.7.2	DNA-abhängige Protein-Protein-Interaktionsanalysen _____	44
3.7.3	Chromatin-Immunpräzipitationen _____	45

4.	Ergebnisse	46
4.1	Der E2 _{Ad12} -Promotor enthält ein cAMP-Response-Element	46
4.2	Das E1A _{12S} -Protein aktiviert den E2 _{Ad12} -Promotor in Abhängigkeit des N-Terminus und der CR1-Domäne	49
4.3	Die zellulären Transkriptionsfaktoren CREB-1 und ATF-1 binden an das E2-CRE des E2 _{Ad12} -Promotors	51
4.4	Die zellulären Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1 aktivieren den E2 _{Ad12} -Promotor	54
4.5	Die zellulären Transkriptionsfaktoren CREB-1 und ATF-1 interagieren mit dem E1A _{12S} -Protein <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	56
4.6	Die E1A _{12S} -vermittelte Aktivierung des E2 _{Ad12} -Promotors korreliert mit der Fähigkeit des adenoviralen Proteins an die zellulären Koaktivatoren p300/CBP zu binden	59
4.7	Die Transkriptionsfaktoren CREB-1 und ATF-1 rekrutieren das E1A _{12S} -Protein an das E2-CRE	62
4.8	Der CBP-Inhibitor Roscovitine und die Histondeacetylase HDAC-1 inhibieren die E1A _{12S} -vermittelte Aktivierung des E2 _{Ad12} -Promotors	63
4.9	Die HDAC-1-vermittelte Repression des E2 _{Ad12} -Promotors wird durch die Expression von p300/CBP aufgehoben	66
4.10	Das Histonprotein H4 wird im Prozeß der Aktivierung des E2 _{Ad12} -Promotors acetyliert	67
4.11	Das E1A _{12S} -Protein moduliert die HAT-Aktivität von p300/CBP	68
4.12	Die E1A _{12S} -vermittelte Aktivierung des E2 _{Ad12} -Promotors korreliert mit der Fähigkeit des viralen Proteins mit der HAT-Funktion von p300/CBP <i>in vivo</i> zu assoziieren	71
4.13	Inhibitoren des cAMP/PKA-abhängigen Signaltransduktionswegs wirken der Transaktivierung des E2 _{Ad12} -Promotors durch das E1A _{12S} -Protein entgegen	73
4.14	Die regulatorischen Untereinheiten RI α und RII α des PKA-Holoenzym interagieren mit dem E1A _{12S} -Protein <i>in vitro</i>	76
4.15	Die regulatorischen Untereinheiten RI α und RII α des PKA-Holoenzym interagieren mit dem E1A _{12S} -Protein <i>in vivo</i>	78
4.16	Das E1A _{12S} -Protein transloziert die RII α -Untereinheit in den Zellkern	81
4.17	Die Koexpression der RII α -Untereinheit und des E1A _{12S} -Proteins führt zu einer starken Transaktivierung des E2 _{Ad12} -Promotors	84
5.	Diskussion	86
5.1	Aktivierung des E2 _{Ad12} -Promotors durch den E2-CRE-gebundenen Komplex bestehend aus CREB-1/ATF-1, p300/CBP und dem E1A _{12S} -Protein	87
5.2	Die E1A _{12S} -vermittelte Translokation der RII α -Untereinheit des PKA-Holoenzym als Voraussetzung für die Aktivierung des E2 _{Ad12} -Promotors	92
5.3	Modell der Aktivierung des E2 _{Ad12} -Promotors durch das E1A _{12S} -Protein	96

6.	Zusammenfassung und Ausblick	98
7.	Literaturverzeichnis	100
8.	Eigene Publikationen	113
9.	Lebenslauf	114
10.	Erklärungen	115

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
As	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
Bq	Becquerel; 1 Bq = 1 Zerfall pro Sekunde
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CAT	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
cDNA	zur RNA komplementäre DNA
Ci	Curie; 1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Bq
CR	„Conserved Region“ (konservierte Region)
CSM	„Complete Supplement Mixture“
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
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
F _C	„Fragment crystallizing“
FITC	Flouresceinisothiocyant
g	Gramm
°C	Grad Celcius
h	Stunde
hnRNA	„heterogeneous nuclear RNA“ (heterogene Kern-RNA)
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
l	Liter
LB	Luria-Bertania
M	Molarität (mol/l)
min	Minute
mol	Mol (Stoffmenge)
mRNA	„messenger RNA“ (Boten-RNA)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nt	Nukleotid
PBS	„Phosphate-Buffered-Saline“ (phosphatgepufferte Salzlösung)
PC-Puffer	„Protein Couple“-Puffer
PCR	„Polymerase Chain Reaction“ (Polymerase-Ketten-Reaktion)

pH	pH-Wert ($\text{pH} = -\log_{10} [\text{Protonenkonzentration (mol/l)}]$)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„rounds per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Einheit ($1 \text{ S} = 10^{-13} \text{ s}$)
s	Sekunde
SOS	„Son-of-Sevenless“
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	„Tris-Buffered-Saline“ (trisgepufferte Salzlösung)
TLC	„Thin Liquid Chromatography“
TRICT	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit (Enzym-Aktivitätseinheit; $1 \text{ U} = 1 \text{ mol/min}$)
V	Volt
<i>v-src</i>	„virus-sarcoma“
VT	Versen-Trypsin
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung g ($1 \text{ x g} = 9,81 \text{ m/s}^2$)

In dieser Arbeit benutzte **Vorsätze** zur Angabe der Zehnerpotenz, mit der die Maßeinheit zu multiplizieren ist:

T	Tera	= 10^{12}
G	Giga	= 10^9
k	Kilo	= 10^3
c	Zenti	= 10^{-2}
m	Milli	= 10^{-3}
μ	Mikro	= 10^{-6}
p	Piko	= 10^{-12}

Finally, we should not be so arrogant as to think that we already know all the possible principles of signaling, and we should certainly expect totally new types of signaling systems to be uncovered.

Tony Hunter

The Salk Institute
La Jolla, California

1. Einleitung

Schon früh entdeckte man, daß Viren Krebserkrankungen bei Mensch und Tier verursachen können. Die Fähigkeit der Tumoviren, Zellen zu transformieren, ist hierbei an bestimmte Virusgene gebunden, die als Onkogene bezeichnet werden. Zu den Onkogenen der DNA-Tumoviren gehören z. B. die T-Antigene der Polyomaviren oder das E1A-Gen der Adenoviren. Die Onkogene kodieren für sog. Onkoproteine, die normalerweise im Replikationszyklus des Virus wichtige Funktionen ausüben, wie beispielsweise die Transkriptionskontrolle viraler und zellulärer Gene. Als intrazelluläre Parasiten besitzen Viren weder eigene energiebildende Stoffwechselsysteme noch Proteinsynthesemaschinerien, die eine eigenständige Virusvermehrung ermöglichen. Da DNA-Tumoviren zumeist differenzierte, teilungsinaktive Zellen infizieren, ist folglich eine der Hauptfunktionen der viralen Onkoproteine zelluläre Funktionen zu verändern und diese für eine optimale Virusreplikation zu modifizieren. Die Veränderungen können hierbei den Intermediärstoffwechsel oder das proliferative Verhalten der Wirtszelle betreffen. Im Mittelpunkt dieser Prozesse steht die Veränderung der zellulären Genexpression durch die Interaktion der viralen Onkoproteine mit zellulären Proteinen, die entscheidenden Einfluß auf das proliferative Verhalten der infizierten Zelle ausüben.

Die funktionelle Analyse der Interaktion viraler Onkoproteine mit zellulären Faktoren kann daher wichtige Einblicke in den Ablauf bestimmter Prozesse in der Zelle geben. Deshalb haben sich Virus-Wirtszell-Systeme als wichtige Modellsysteme für das heutige Verständnis molekularer Prozesse in Eukaryontenzellen erwiesen. Hier wurde z. B. das Spleißen von RNA (Berk und Sharp, 1978) und die Verpackung von DNA mit Histonen in Nukleosomen (Gariglio *et al.*, 1979) identifiziert. Zudem sind hier grundlegende Erkenntnisse der eukaryontischen Genexpression aufgeklärt worden (als Übersichten s. Brockmann und Esche, 1995; Berk *et al.*, 1998). Weiterhin konnten, aufgrund der Fähigkeit der viralen Onkogene Zellen zu transformieren, in Virus-Zell-Systemen wichtige Erkenntnisse über die Mechanismen der Tumorentstehung gewonnen werden.

1.1 Adenoviren

Die Familie der *Adenoviridae* gliedert sich in die Genera *Aviadenovirus* (Vogel-Adenoviren) und *Mastadenovirus*, welche die verschiedenen Virusspezies der Säugetiere einschließen (Norrby *et al.*, 1976). Die humanpathogenen Adenoviren (Ad) wurden erstmals 1953 von Wallace Rowe und seinen Mitarbeitern aus chirurgisch entfernten Tonsillen und adenoidem Gewebe isoliert und in Kultur vermehrt (Rowe *et al.*, 1953).

Heute sind über 40 humanpathogene Adenovirus-Serotypen beschrieben, die nach DNA-Sequenzhomologie, nach Analyse des Restriktionsenzymverdaus der viralen DNA, Hämagglutinations-Reaktionen mit Ratten- und Rhesusaffenerythrocyten, dem Ausmaß der Onkogenität in Nagern und der Polypeptid-Zusammensetzung des Virions in sechs Subgenera (A-F) eingeteilt werden (als Übersicht s. Bailey und Mautner, 1994). Humanpathogene

Adenoviren verursachen meist milde Infektionen des Respirationstraktes, des Gastrointestinaltraktes oder der Bindehaut des Auges (als Übersicht s. Horwitz, 1990). Obwohl humanpathogene Adenoviren in Nagetieren Tumoren erzeugen können (s. Kap. 1.1.2), ist bisher kein kausaler Zusammenhang zwischen der Entstehung menschlicher Tumoren und der Infektion durch humanpathogene Adenoviren festgestellt worden. Jedoch wird gegenwärtig kontrovers diskutiert, ob die E1A-Onkoproteine der Adenoviren an der Entstehung des Ewing-Sarkoms beteiligt sind (Sanchez-Prieto *et al.*, 1999; Melot und Delattre, 1999; Kovar, 1999).

Das Adenovirus ist ein nicht-membranumschlossenes, ikosaedrisches Virion mit einem Durchmesser von 70-90 nm, in das die lineare doppelsträngige DNA von einer Größe von 36-38 kbp eingeschlossen ist (als Übersicht s. Flint und Broker, 1981). Das Capsid des Virions ist aus 252 Capsomeren aufgebaut, wobei hier durch die geometrische Anordnung dieser Untereinheiten zwischen 240 Hexoncapsomeren und zwölf Pentoncapsomeren unterschieden wird (als Übersicht s. Philipson, 1983). Jedes Pentoncapsomer trägt auf seiner Oberfläche, durch die Pentoncapsomerbasis verankert, ein Fiberprotein. Die Fiberproteine vermitteln die Adsorption des Virus an spezifische Rezeptoren der Zielzelle (Londberg-Holm und Philipson, 1969). Es wurde gezeigt, daß Adenoviren u. a. den Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor zur Adsorption an die Zelloberfläche nutzen (Roelvink *et al.*, 1998). Das Virus wird durch Rezeptor-vermittelte Endozytose an Clathrin-reichen Regionen in die Zelle aufgenommen. Durch die anschließende Freisetzung aus den Endosomen, unter Verlust der Pentoncapsomere und Fiberproteine, gelangt das Virus in das Cytoplasma der Wirtszelle. Von dort aus wird das pentoncapsomerlose Virus, möglicherweise über die Bindung der Hexoncapsomere entlang der Mikrotubuli, zu den Kernporen transportiert (Pastan *et al.*, 1987).

Nach Erreichen der Kernporen wird die virale DNA in den Zellkern transportiert. In Abhängigkeit von der Wirtszelle bestehen zwei mögliche Formen des Infektionsverlaufes: die **produktive Infektion** und die **abortive Infektion**.

1.1.1 Die produktive Infektion

Bei der produktiven oder auch lytischen Infektion permissiver menschlicher Zellen durch humanpathogene Adenoviren kommt es zu einer viralen DNA-Replikation und Produktion von Virusnachkommen. Nach Eintritt in den Zellkern erfolgt die Expression des Virusgenoms und die Replikation der viralen DNA. Diese Prozesse werden im lytischen Entwicklungszyklus grob in eine frühe und eine späte Phase unterteilt. Im frühen Verlauf der Infektion kommt es zur Expression der sog. frühen Gene E1A, E1B, E2, E3 und E4 (Abb. 1; Broker *et al.*, 1984).

Jede der frühen Regionen E1-E4 wird durch die zelluläre RNA-Polymerase II an einem der beiden DNA-Stränge transkribiert. Eine Vielzahl der Genprodukte dieser Regionen sind notwendig, um Prozesse in der Zelle zu initiieren, die zu einer Umprogrammierung des

zellulären Syntheseapparates führen und somit die Bildung reifer Virusnachkommen gewährleisten.

Die Proteine der E1A-Region regulieren im lytischen Entwicklungszyklus die Expression der adenoviralen Gene. Zusätzlich wird die Expression zellulärer Gene durch die E1A-Proteine reguliert (als Übersicht s. Brockmann und Esche, 1995). Die E1B-Region kodiert für zwei Proteine, die unter anderem für die Akkumulation, Stabilisierung und Translation viraler mRNAs verantwortlich sind (Pilder *et al.*, 1986; Zhang *et al.*, 1995). Eine weitere Funktion der E1B-Proteine ist es, die E1A-induzierte Apoptose zu inhibieren (als Übersicht s. White, 1995). Die E2-Region kodiert für replikationsrelevante Proteine. Hierzu zählen eine virale DNA-Polymerase, ein DNA-Bindeprotein und das terminale Protein (Sussenbach und van der Vliet, 1983). Die Proteine der E3-Region schützen die Adenovirus-infizierten Zellen vor zellulären Immunantworten. Sie verhindern beispielsweise den Transport von MHC-Klasse-I-Antigenen an die Zelloberfläche und damit die Elimination der infizierten Zelle durch cytotoxische T-Lymphozyten (Horwitz *et al.*, 1995). Die wenig charakterisierte E4-Region kodiert für Proteine, die in Kooperation mit E1B-Proteinen den Transport viraler mRNA-Spezies regulieren. Weiterhin sind die E4-Proteine in die virale und zelluläre Genexpression sowie den Viruspartikel-Zusammenbau involviert (als Übersicht s. Shenk, 1996).

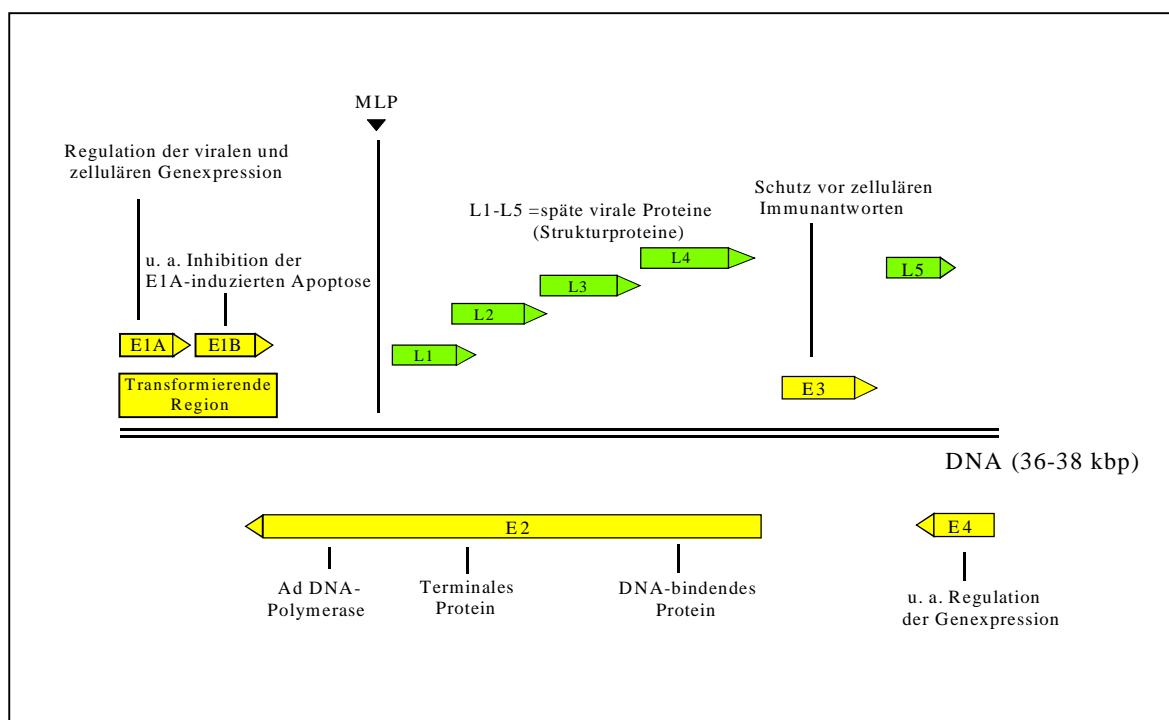


Abb. 1: Schematische Darstellung der Genomorganisation humanpathogener Adenoviren. Die lineare doppelsträngige DNA der Adenoviren ist der Übersichtlichkeit halber stark vereinfacht dargestellt. Die frühen (E für „early“; E1-E4, gelb) und späten (L für „late“; L1-L5, grün) Regionen sowie wichtige Funktionen der Genprodukte der jeweiligen Regionen sind angegeben (modifiziert nach Watson *et al.*, 1987).

Im späten Verlauf der Infektion, etwa zehn bis zwölf Stunden nach Beginn der Virus-DNA-Replikation, werden die sog. späten Regionen transkribiert. Diese stehen unter der Kontrolle des „Major Late Promoters“ (MLP) (Evans *et al.*, 1977; Nevins und Darnell,

1978). Aus einer nukleären Vorläufer-RNA werden durch alternatives Spleißen über 20 mRNAs prozessiert, die in fünf Familien, L1 bis L5, eingeteilt werden. Die späten mRNAs kodieren für virale Strukturproteine (z. B. Capsomere, Fiberproteine; Abb. 1) oder deren Vorläufer (als Übersicht s. Flint und Broker, 1981). Diese werden anschließend in den Zellkern transportiert, wo der Zusammenbau infektiöser Virionen stattfindet (Horwitz *et al.*, 1969). Durch die Anhäufung der Virionen im Zellkern kommt es zum Platzen und damit zum Tod der Wirtszelle. Hierbei werden bis zu 10^4 infektiöse Virionen freigesetzt.

1.1.2 Die abortive Infektion

Im Gegensatz zu der produktiven Infektion vollbringen humanpathogene Adenoviren in nicht-permissiven Zellen (z. B. Nagetierzellen) eine abortive Infektion. In diesen Zellen unterbleibt die Bildung infektiöser Virusnachkommen (Doerfler, 1969). Das Virus gelangt zwar in die Zelle und die frühen Genregionen werden entsprechend der produktiven Infektion exprimiert, die virale DNA-Replikation und/oder die Expression der späten Regionen und die damit verbundene Bildung viraler Strukturproteine ist aber gestört (Esche *et al.*, 1979; Esche und Siegmann, 1982).

Bei der abortiven Infektion kann es zu einer vollständigen oder partiellen Integration des viralen Genoms in das zelluläre Genom kommen. Durch die konstitutive Expression der Genprodukte der E1A- und E1B-Region kann die abortive Infektion in 10^{-6} bis 10^{-5} Fällen zu einer Transformation der infizierten Zelle führen (van der Eb und Bernards, 1984). Diese *in vitro* transformierten Zellen sind dann in Abhängigkeit vom Adenovirus-Serotyp imstande, im immunkompetenten Nagetier ein Tumorwachstum zu induzieren (als Übersicht s. Williams *et al.*, 1995). In Bezug auf ihre Tumorigenität in Nagetieren werden die Adenoviren in nicht-onkogene (z. B. Ad2/Ad5) und onkogene Serotypen (z. B. Ad12) unterteilt (Wadell, 1984). In Untersuchungen mehrerer Arbeitsgruppen wurde gezeigt, daß das tumorigene Potential allein in der E1A-Region lokalisiert ist (als Übersicht s. Williams *et al.*, 1995). So bewiesen Mutationsanalysen mit chimären Adenoviren, daß diese nur dann ein tumorigenes Potential besaßen, wenn die E1A-Region vom onkogenen Serotyp Ad12 stammt.

1.2 Struktur und Proteine der E1A-Region des onkogenen Serotyps Ad12

Die E1A-Region ist am linken Ende des Ad-Genoms lokalisiert (Abb. 1). Von allen Adenovirus-Serotypen wird von der E1A-Region eine hnRNA transkribiert, aus der durch alternative Spleißprozesse verschiedene mRNA-Spezies generiert werden.

Im Falle des Adenovirus-Serotyps 12 werden durch Spleißprozesse sechs verschiedene mRNAs (13S, 12S, 11S, 10S, 9,5S und 9S) generiert, die für fünf Proteine (266R, 235R, 106R, 52R und 53R) kodieren (Abb. 2; Perricaudet *et al.*, 1980; Sawada und Fujinaga, 1980; Brockmann *et al.*; 1990). Das 266R-Protein (generiert von der 13S mRNA; daher im Folgenden auch als E1A_{13S} bezeichnet) und das 235R-Protein (generiert von der 12S

mRNA; E1A_{12S}) sind die dominant auftretenden Proteine. Beide Proteine werden im gleichen Leserahmen translatiert. Sie unterscheiden sich nur durch das Fehlen eines internen Bereiches bestehend aus 31 Aminosäuren im E1A_{12S}-Protein. Dieser Bereich entspricht der konservierten Region 3 und repräsentiert eine der drei E1A-Regionen (CR1, CR2 und CR3), die zwischen den verschiedenen Adenovirus-Serotypen hoch-konserviert sind (Kimelmann *et al.*, 1985). Neben dem nicht-konservierten Aminoterminus, beinhalten diese konservierten Regionen der E1A-Proteine die meisten transkriptionsregulierenden Funktionen, die für eine effiziente Virusreplikation und die zelluläre Transformation notwendig sind (als Übersicht s. Brockmann und Esche, 1995).

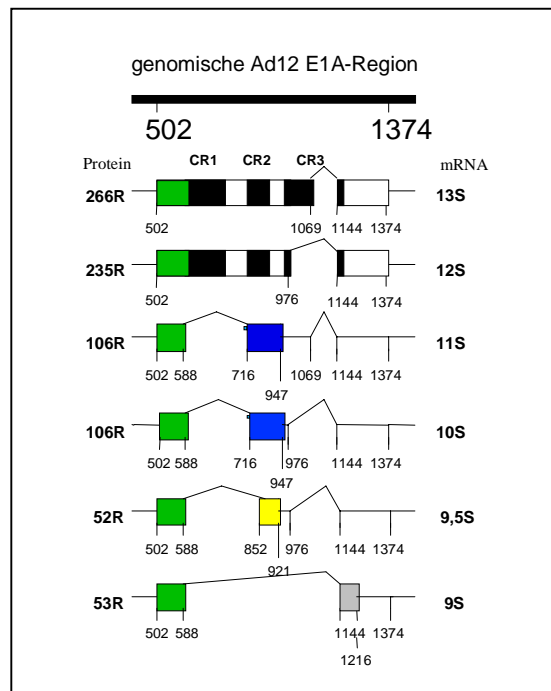


Abb. 2. Schematische Darstellung der mRNAs und Proteine der E1A-Region des onkogenen Serotyps Ad12. Die Rechtecke stellen die von den verschiedenen mRNAs translatierten Proteine dar. Die farbigen Rechtecke stehen für verschiedene Leserahmen. Die schwarzen Rechtecke repräsentieren die zwischen den verschiedenen Ad-Serotypen konservierten Regionen 1-3 (CR1, CR2 und CR3). Die Zahlen unter den Linien bezeichnen die Nucleotidpositionen im adenoviralen Genom. Sie geben das gemeinsame Startcodon, Spleißstellen und das erste Nucleotid des Stoppcodons an. (S) Svedberg-Einheit; (R) Aminosäure (nach Brockmann und Esche, 1995).

Aufgrund des Spleißmusters der 11S, 10S, 9,5S und 9S mRNAs kommt es bei den von diesen mRNAs translatierten Proteinen zu einer Leserahmenverschiebung nach Aminosäure 29. Dadurch weisen sie, mit Ausnahme der ersten 29 Aminosäuren, keine Sequenzhomologie mehr zum E1A_{13S}- und E1A_{12S}-Protein auf (Abb. 2). In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, daß das 52R-Protein die Aktivität des murinen MHC-Klasse-I-Promotors reprimiert (Brockmann *et al.*, 1996). Inwieweit dadurch das 52R-Protein an der Ad12-vermittelten Onkogenität beteiligt ist, wird gegenwärtig in unserer Arbeitsgruppe bearbeitet. Die funktionellen Aktivitäten des 52R-, 53R- und 106R-Proteins im lytischen Entwicklungszyklus sind bis heute nicht bekannt.

1.3 Kontrolle der Genexpression durch die E1A-Proteine: Aktivierung und Repression

Die E1A-Proteine sind im lytischen Entwicklungszyklus für die Aktivierung der Expression der adenoviralen Transkriptionseinheiten (E1B, E2, E3, E4 und MLP) essentiell (Berk, 1986). Neben der Regulation der viralen Gene kann die Expression zellulärer Gene durch E1A-Proteine sowohl positiv (z. B. hsp70, β -Tubulin oder c-jun) als auch negativ (z. B. Insulin, Fibronektin oder Collagen) reguliert werden (als Übersicht s. Brockmann und Esche, 1995). Die transkriptionsregulierenden Funktionen der E1A-Proteine werden hauptsächlich über die konservierten Regionen CR1, CR2 und CR3 sowie dem nicht-konservierten N-Terminus vermittelt.

Da E1A-Proteine keine sequenzspezifische DNA-Bindeaktivität besitzen (Ferguson *et al.*, 1985), vermitteln sie ihre transkriptionellen Funktionen durch Protein-Protein-Interaktionen mit zellulären Faktoren (Abb. 3). Diese zellulären Faktoren können in folgende Klassen eingeteilt werden:

(1) *Generelle Transkriptionsfaktoren und Mediatoren*

Die spezifische Initiation der Transkription erfordert, neben der RNA-Polymerase II, sog. generelle Transkriptionsfaktoren und Mediator Komplexe (als Übersicht s. Berk, 1999). Durch eine direkte Interaktion mit diesen generellen Faktoren kann die Zinkfinger-Transaktivierungsdomäne CR3 des E1A_{13S}-Proteins die virale Genexpression in der infizierten Zelle effizient regulieren. Daten aus der Arbeitsgruppe von Berk zeigten, daß neben der Bindung an generelle Transkriptionsfaktoren, die Interaktion der CR3-Domäne mit dem humanen hSrb/Mediator-Multiproteinkomplex über dessen Sur-2-Untereinheit im Prozeß der E1A_{13S}-vermittelten Aktivierung von Zielgenen entscheidend ist (Boyer *et al.*, 1999).

(2) *DNA-sequenzspezifisch-bindende Transkriptionsfaktoren*

DNA-bindende Transkriptionsfaktoren, wie z. B. ATF-2 und c-Jun, dienen als Adaptoren für E1A-Proteine im Zielpromotor (Abb. 3A, Liu und Green, 1990; Duyndam *et al.*, 1996). Diese Interaktion bewirkt häufig eine Transkriptionsaktivierung des Zielgens. Durch die Rekrutierung des E1A_{13S}- oder des E1A_{12S}-Proteins an promotorgebundene c-Jun/ATF-2-Transkriptionsfaktorkomplexe kommt es z. B. zu einer Aktivierung des c-jun-Promotors (Duyndam *et al.*, 1996). Das c-Jun-Protein ist in zahlreiche zelluläre Prozesse, wie die Differenzierung und die Proliferation, involviert (Angel und Karin, 1991). Man vermutet, daß die Expression des c-Jun-Proteins durch die E1A-Proteine im lytischen Entwicklungszyklus essentiell ist, da dieses Protein in Signalkaskaden mitwirkt, welche die arretierte Zelle in den Zellzyklus zurückführt.

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

Zu den Repressoren von DNA-sequenzspezifisch-bindenden Transkriptionsfaktoren zählt z. B. das Retinoblastom-Protein pRB, das als ein wichtiger Faktor der Zellzyklusregulation u. a. den G1/S-Übergang durch die Interaktion mit den E2F-Transkriptionsfaktoren inhibiert (als Übersicht s. Adams und Kaelin, 1998). Die E2F-Transkriptionsfaktoren sind für die Aktivierung zellulärer, proliferationsrelevanter Gene verantwortlich (Slansky und Farnham, 1996). Die inhibitorischen E2F/pRB-Komplexe werden in Anwesenheit des E1A_{12S}-Proteins durch die Interaktion der CR1- und CR2-Domäne mit dem pRB-Protein dissoziiert. Hierbei wird transkriptionsaktives E2F freigesetzt (Abb. 3B; Ikeda und Nevins, 1993). Dies resultiert in der Aktivierung E2F-abhängiger Zielgene, wie dem der Dihydrofolatreduktase oder der Thymidinkinase. Beide Genprodukte sind im Zuge des lytischen Entwicklungszyklus für die virale DNA-Replikation notwendig, da sie als metabolische Enzyme an der Neusynthese von DNA-Nukleotiden beteiligt sind.

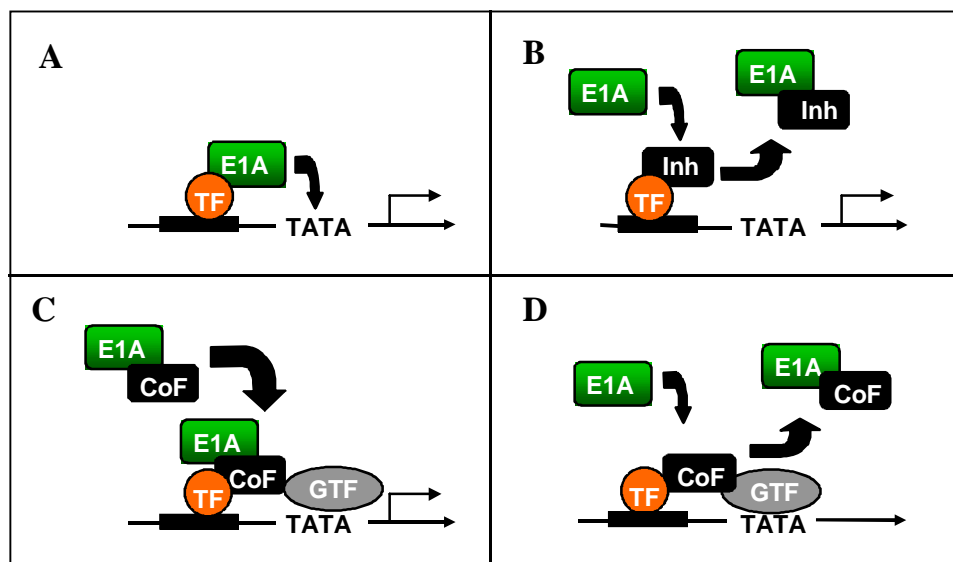


Abb. 3. Mechanismen der Transkriptionsregulation durch E1A-Proteine. **A.** Regulation durch Rekrutierung der E1A-Proteine (E1A) im Aktivierungsprozeß von Zielgenen durch DNA-sequenzspezifisch-bindende Transkriptionsfaktoren (TF) und anschließende Interaktion mit der basalen Transkriptionsmaschinerie (GTF). **B.** Dissoziation inhibitorisch wirkender Faktoren (Inh) aus Transkriptionsfaktorkomplexen und damit verbundene Aktivierung des Transkriptionsfaktors und der Expression des Zielgens. **C.** Rekrutierung von Koaktivatoren im Prozeß der Transkriptionsaktivierung eines Zielgens durch E1A-Proteine. **D.** Dissoziation von Koaktivatoren (CoF) aus transkriptionsaktiven Koaktivator/Transkriptionsfaktorkomplexen durch E1A-Proteine und damit Repression des Zielgens. Einzelheiten s. Text.

(4) *Zelluläre Koaktivatoren*

Zelluläre Koaktivatoren wie p300/CBP vermitteln den Kontakt zwischen DNA-sequenzspezifisch-bindenden Transkriptionsfaktoren und Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie (als Übersicht s. Janknecht und Hunter, 1996). So führt die Interaktion des E1A_{12S}-Proteins unter Beteiligung des N-Terminus und der CR1-Domäne zur Dissoziation der Koaktivatoren p300/CBP von DNA-gebundenen

Transkriptionsfaktorkomplexen und damit zur Repression des Zielgens (Abb. 3D). Durch diesen Mechanismus wird beispielsweise die Transkription p53-abhängiger Zielgene unterdrückt (Avantaggiati *et al.*, 1997; Lill *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 1997). Die Aktivierung von Zielgenen durch den Tumorsuppressor p53 führt zu einer Zellzyklus-Arretierung in der G1-Phase oder zur Apoptose (als Übersicht s. Adams und Kaelin, 1998). Die Repression p53-aktivierter Zielgene durch die E1A_{12S}-vermittelte Dissoziation der Koaktivatoren p300/CBP von p53 führt demzufolge zu einer Induktion der Proliferation. Über den Mechanismus der Rekrutierung von Koaktivatoren im Prozeß der Transkriptionsaktivierung durch die E1A-Proteine ist bis heute wenig bekannt. Ein möglicher Mechanismus der Rekrutierung von p300/CBP in der E1A_{12S}-aktivierten Genexpression wurde im Laufe meiner Promotion ermittelt (Fax *et al.*, 2000; Abb. 3C).

Weil p300/CBP entscheidende Integratoren verschiedener zellulärer Signaltransduktionswege darstellen, ist die Interaktion der E1A-Proteine mit den Koaktivatoren p300/CBP eine der grundlegenden Möglichkeiten, in zelluläre Signalketten einzugreifen und damit eine veränderte Genexpression zu bewirken. Da eine Modulation der Koaktivatorfunktionen von p300/CBP mit der Aktivität der E1A-Proteine im Prozeß des lytischen Entwicklungszyklus oder der zellulären Transformation korreliert, werden diese zellulären Koaktivatoren nachfolgend dargestellt.

1.4 Interaktion der zellulären Koaktivatoren p300/CBP mit den E1A-Proteinen

Der zelluläre Koaktivator p300 wurde aufgrund seiner Fähigkeit mit den E1A-Onkoproteinen *in vivo* zu interagieren identifiziert (Eckner *et al.*, 1994). Zahlreiche Studien belegen, daß diese Interaktion für die Regulation zellulärer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Transformation und Apoptose durch E1A-Proteine entscheidend ist (als Übersicht s. Giordano und Avantaggiati, 1999). Der nahverwandte Koaktivator CBP wurde unabhängig von p300 als zellulärer Faktor identifiziert, der spezifisch mit der phosphorylierten Form des cAMP/PKA-abhängigen Transkriptionsfaktors CREB interagiert (Chrivia *et al.*, 1993). Da sowohl die Bindung von CBP als auch von p300 an die phosphorylierte Form von CREB dessen transkriptionsregulierende Aktivität verstärkt, wurde definiert, daß p300 und CBP Koaktivatorfunktionen besitzen (Lundblad *et al.*, 1995; Arany *et al.*, 1995; Kwok *et al.*, 1994).

Die Annahme, daß p300 und CBP aufgrund ihrer hohen strukturellen Homologie gleiche biologische Funktionen ausüben, wurde durch Untersuchungen eingeschränkt, die belegten, daß p300 und CBP distinkte Funktionen in der Differenzierung und dem Zellzyklus-Arrest von Zellen durch Retinsäure haben (Kawasaki *et al.*, 1998). Des Weiteren wurde mit null-allelen („knock-out“) Mäusen für p300 und CBP gezeigt (Kung *et al.*, 2000; Yao *et al.*, 1998), daß p300 und CBP verschiedene Prozesse während der Embryogenese eines

Organismus regulieren. Interessanterweise bewiesen diese Untersuchungen, daß isolierte null-allele p300-Mausfibroblastenzellen keinen Defekt in der CREB-vermittelten Genexpression aufweisen. Aufgrund dieser Ergebnisse sind p300 und CBP bezüglich der Regulation CREB-abhängiger Zielgene als äquivalent zu betrachten (Yao *et al.*, 1998). Wenn nicht gesondert erwähnt, werden im weiteren Verlauf p300 und CBP daher als p300/CBP bezeichnet.

1.4.1 Die Koaktivatorfunktionen von p300/CBP

Die Koaktivatoren p300/CBP enthalten verschiedene Proteinmotive, wie die Bromodomäne, die Kinase-Interaktions (KIX)-Domäne, eine Domäne mit Histonacetyltransferase (HAT)-Aktivität oder drei Cystein/Histidinreiche (C/H)-Regionen (Abb. 4). Diese Domänen stellen wichtige Bindestellen für DNA-bindende Transkriptionsfaktoren, Kofaktoren und Faktoren der generellen Transkriptionsmaschinerie dar (Abb. 4).

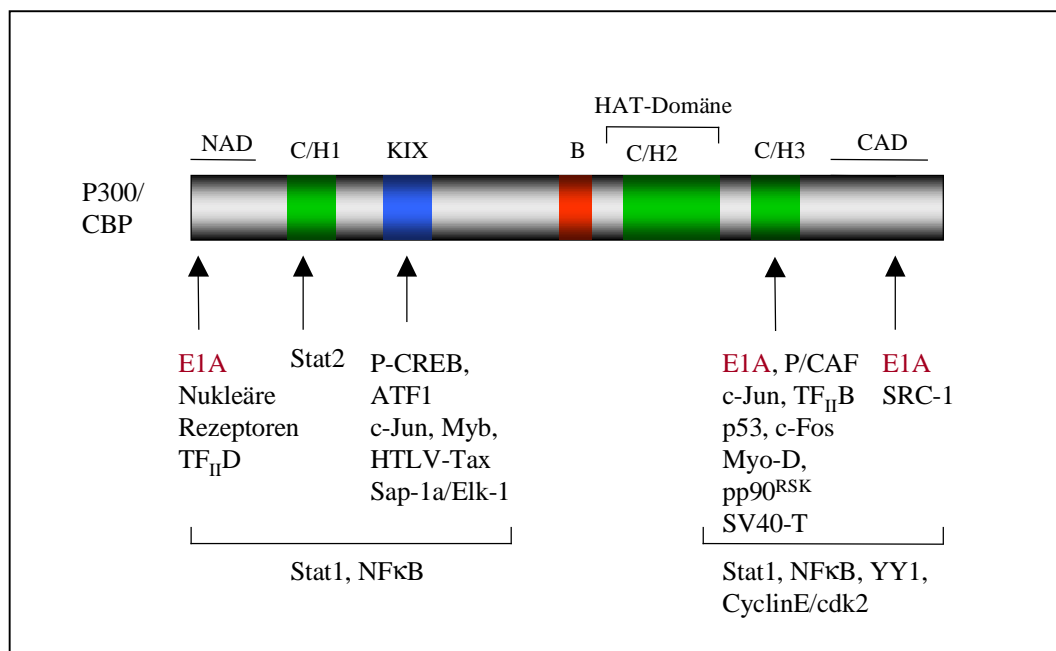


Abb. 4. Schematische Darstellung der zellulären Koaktivatoren p300/CBP. Die Cystein/Histidin-reichen Regionen (C/H1, C/H2 und C/H3; grün dargestellt), die Bromodomäne (B; rot dargestellt) und die KIX-Domäne (KIX; blau dargestellt) sind gekennzeichnet. Die Histonacetyltransferase (HAT)-Domäne sowie die N-terminale (NAD) als auch die C-terminale (CAD) Aktivierungsdomäne sind durch Linien markiert. Die bis heute bekannten Interaktionsbereiche für zelluläre Faktoren in p300/CBP sind angegeben (modifiziert nach Snowden und Perkins, 1998).

Inzwischen ist bekannt, daß eine Vielzahl von DNA-sequenzspezifisch-bindenden Transkriptionsfaktoren mit den Koaktivatoren p300/CBP komplexiert vorliegen und hierdurch erst ihre transkriptionellen Funktionen ausüben können. Hierzu gehören neben CREB beispielsweise c-Jun, c-Fos, NFκB, p53, MyoD und die nukleären Hormonrezeptoren (Abb. 4; als Übersicht s. Snowden und Perkins, 1998). Neben der Interaktion mit sequenzspezifisch-bindenden Transkriptionsfaktoren dienen p300/CBP als molekulare Plattformen für weitere Koaktivatoren wie P/CAF, SRC-1 und p/CIP (Smith *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996;

Yao *et al.*, 1996, Torchia *et al.*, 1998). Die Eigenschaften von p300/CBP, mit einer Vielzahl signalabhängig regulierter Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren zu interagieren, belegen, daß p300/CBP als entscheidende Integratoren verschiedene Signaltransduktionswege auf transkriptioneller Ebene koordinieren. Durch die Koaktivatoren p300/CBP besteht für die Zelle eine Möglichkeit, bei einer begrenzten Anzahl von Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren, spezifische Multiproteinkomplexe an Zielpromotoren zu rekrutieren (Korzus *et al.*, 1998). Hierdurch wird auf zelluläre Signale wie Ca^{2+} oder cAMP hin eine spezifische Expression von Genen, z. B. während der Proliferation oder Differenzierung, erreicht.

Der Mechanismus der p300/CBP-vermittelten Transkriptionsaktivierung ist dagegen unklar. P300/CBP besitzen, wie zuvor beschrieben, zahlreiche Protein-Protein-Interaktionsdomänen für viele, in transkriptionsregulierende Prozesse involvierte Faktoren (Abb. 4). So wurde gezeigt, daß p300/CBP über die C/H3-Domäne das RNA-Polymerase II-Holoenzym an CREB rekrutieren (Nakajima *et al.*, 1997). Daher wirken p300/CBP als molekulare Brückenproteine und vermitteln den Kontakt zwischen DNA-sequenzspezifisch-bindenden Transkriptionsfaktoren und dem generellen Transkriptionsapparat. Dies führt möglicherweise zu einer Stabilisierung des Präinitiationskomplexes und hierdurch zu einer erhöhten Transkriptionsrate. Weiterhin besitzen p300/CBP im N- und C-terminalen Bereich Transaktivierungsdomänen, die in den Aktivierungsprozeß stimulierend eingreifen können (Yuan *et al.*, 1996).

Ein weiteres Modell der Transkriptionsregulation durch p300/CBP wurde in unserer Arbeitsgruppe sowie von der Arbeitsgruppe von Maniatis vorgeschlagen (Brockmann *et al.*, 1999; Kim und Maniatis, 1997). So zeigten Untersuchungen zur Regulation des Enhancers A des H-2K^b-Promotors, daß p300/CBP eine Plattform für Transkriptionsfaktoren wie AP-1, ATF, und rel/NFκB bieten. Die Rekrutierung von p300/CBP durch AP-1, ATF und rel/NFκB ermöglicht anscheinend die exakte dreidimensionale Positionierung der Transkriptionsfaktoren und damit die notwendige synergistische Aktivierung des Enhancers A durch diese Transkriptionsfaktoren (Brockmann *et al.*, 1999).

Die Komplexität der transkriptionsregulierenden Funktionen von p300/CBP wurde durch Untersuchungen von Bannister und Kouzarides (1996) und Ogryzko *et al.* (1996) erweitert, die bewiesen, daß p300/CBP eine intrinsische Histonacetyltransferase (HAT)-Aktivität besitzen.

In vivo und *in vitro* resultiert die Assoziation von DNA mit Histonen in einer übergeordneten Struktur, die als Nukleosom bezeichnet wird (Kornberg, 1974). Diese Verpackungsform verhindert die Zugänglichkeit der DNA für regulierende Faktoren an den Promotoren der Zielgene (als Übersicht s. Kornberg und Lorch, 1999). Weiterhin besteht eine eindeutige Korrelation zwischen der Hyperacetylierung der lysinreichen N-Termini von Histonen und transkriptionell aktiven Genen (als Übersicht s. Grunstein, 1997). Nach der heutigen Vorstellung geht man davon aus, daß die spezifische Rekrutierung der HAT-Aktivität von p300/CBP, gefolgt von einer Acetylierung der Histone und Destabilisierung des Nukleosoms, zu einer erhöhten Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren führt.

Interessanterweise werden auch Nicht-Histonproteine wie TF_{II}F, TF_{II}E, GATA, HMGI(Y) und p53 durch p300/CBP acetyliert (Boyes *et al.*, 1998; Imhof *et al.*, 1997; Munshi *et al.*, 1998; Gu und Roeder, 1997). Die Acetylierung dieser Proteine kann dessen DNA-Bindungseigenschaften modulieren oder Protein-Protein-Interaktionen verhindern.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Koaktivatoren p300/CBP durch verschiedene Mechanismen in die Transkriptionsregulation eingreifen:

- (1) durch die Rekrutierung des RNA-Polymerase II-Holoenzym und ihre zahlreichen Protein-Protein-Interaktionsdomänen stellen sie den Kontakt zwischen sequenzspezifisch-bindenden Transkriptionsfaktoren und der generellen Transkriptionsmaschinerie her.
- (2) durch die Acetylierung von Histonen destabilisieren sie die nukleosomale Struktur und erhöhen damit die Zugänglichkeit des Promotors für DNA-bindende Transkriptionsfaktoren und das RNA-Polymerase II-Holoenzym.
- (3) durch die Acetylierung von Nicht-Histonproteinen modulieren sie Protein-DNA- oder Protein-Protein-Interaktionen am Zielpromotor.

1.4.2 Modulation der Koaktivatorfunktionen von p300/CBP durch die E1A-Proteine

Die zentrale Funktion von p300/CBP, eine Vielzahl zellulärer Prozesse zu regulieren, verdeutlicht, daß die Interaktion der E1A-Proteine mit diesen Koaktivatoren im Prozeß des lytischen Entwicklungszyklus oder der zellulären Transformation eine wichtige Rolle spielt. Durch molekulare Analysen wurden bis jetzt drei Interaktionsdomänen für die E1A-Proteine in p300/CBP identifiziert (Kurokawa *et al.*, 1998, Lipinski *et al.*, 1999). Diese umspannen den N-Terminus, die Cystein/Histidinreiche Region C/H3 und die glutaminreiche Domäne im C-Terminus von p300/CBP (Abb. 4).

Die Mechanismen, wie E1A-Proteine durch die Interaktion mit den Koaktivatoren p300/CBP die Transkription von Zielgenen sowohl positiv als auch negativ modulieren, werden nachfolgend dargestellt.

1.4.2.1 Repression der Koaktivatorfunktionen von p300/CBP durch die E1A-Proteine

Im Falle der transkriptionellen Repression führt die Interaktion des N-Terminus und der CR1-Domäne der E1A-Proteine mit p300/CBP zu einer Dissoziation dieser Koaktivatoren von promotorgebundenen Transkriptionsfaktorkomplexen und zur Inhibierung der Expression des betreffenden Zielgens (Abb. 3D; Arany *et al.*, 1995; Lundblad *et al.*, 1995; Lill *et al.*, 1997; Somasundaram und El-Deiry, 1997). So wird beispielsweise durch die Interaktion des E1A_{12S}-Proteins mit den Koaktivatoren p300/CBP die Expression p53-abhängiger Zielgene wie p21 und bax inhibiert. Hierdurch verhindert das E1A_{12S}-Protein p53-induzierte zelluläre

Prozesse wie den p21-vermittelten Zellzyklus-Arrest oder die Apoptose-Induktion durch das bax-Protein.

Eine andere Möglichkeit, wie E1A-Proteine die Koaktivatorfunktionen von p300/CBP reprimieren, besteht in einer Konkurrenz mit Transkriptionsfaktoren oder Kofaktoren um die Bindung an p300/CBP (Bannister und Kouzarides, 1995; Puri *et al.*, 1998). Hierdurch wird eine Expression des betreffenden Zielgens reprimiert. So verdrängt das E1A_{12S}-Protein den p300/CBP-assoziierten Faktor P/CAF von p300/CBP und inhibiert dadurch die Expression von Genen, die für die Muskeldifferenzierung benötigt werden. Interessanterweise wird hierbei die Interaktion zwischen p300/CBP und dem muskelspezifischen Transkriptionsfaktor MyoD durch das E1A_{12S}-Protein nicht beeinträchtigt (Puri *et al.*, 1998).

Ein weiterer, jedoch gegenwärtig kontrovers diskutierter Mechanismus der E1A-vermittelten Regulation p300/CBP-abhängiger Zielgene, beinhaltet die Modulation der intrinsischen HAT-Aktivität von p300/CBP (s. Kap. 1.4.2.2). Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, daß sowohl das E1A_{13S}- als auch das E1A_{12S}-Protein die HAT-Aktivität von p300/CBP durch Bindung an die HAT-Domäne selbst oder durch eine Interaktion mit der C/H3-Domäne in biochemischen Analysen inhibiert (Chakravarti *et al.*, 1999; Hamamori *et al.*, 1999; Perissi *et al.*, 1999). Zelluläre Zielgene, deren Expression durch eine E1A-vermittelte Inhibition der HAT-Aktivität von p300/CBP reprimiert werden, sind bisher jedoch nicht bekannt.

1.4.2.2 Aktivierung der Koaktivatorfunktionen von p300/CBP durch die E1A-Proteine

Über die Mechanismen der Aktivierung der p300/CBP-abhängigen Transkription durch die E1A-Proteine ist bis heute weitaus weniger bekannt als über ihre Repression (s. Kap. 1.4.2.1). So zeigten Arbeiten von Trouche und Kouzarides (1996), daß das E1A_{12S}-Protein eine Rekrutierung von p300/CBP an den promotorgebundenen E2F-Transkriptionsfaktor ermöglicht und hierdurch die Expression des Zielgens aktiviert. Diese Transkriptionsaktivierung ist hierbei unabhängig von der Freisetzung des E2F-Proteins aus dem inhibitorischen E2F/pRB-Proteinkomplex durch das E1A_{12S}-Protein.

Eine andere Möglichkeit, die Koaktivatorfunktionen von p300/CBP zu induzieren, besteht in einer E1A-vermittelten Dissoziation repressorischer Faktoren von p300/CBP. Hier zeigten die Ergebnisse von Nakatani und seinen Mitarbeitern, daß die Dissoziation von P/CAF aus p300/CBP-Komplexen durch das E1A_{12S}-Protein mit einer Induktion der S-Phase des Zellzyklus korreliert (Yang *et al.*, 1996). Man vermutet daher, daß Komplexe bestehend aus den Koaktivatoren p300/CBP und dem E1A_{12S}-Protein eine aktive Funktion in der Regulation proliferationsrelevanter Gene besitzen (Yao *et al.*, 1998). Diese Annahme wird weiterhin durch die Analysen der null-allelen p300-Mäuse bekräftigt, die eindeutig zeigten, daß p300/CBP entscheidende Funktionen in der Induktion der Proliferation besitzen (Yao *et al.*, 1998).

Im Gegensatz zu der unter 1.4.2.1 beschriebenen Inhibition der HAT-Aktivität von p300/CBP durch die E1A-Proteine beschreiben andere Arbeitsgruppen eine positive Modulation dieser enzymatischen Aktivität durch die adenoviralen Proteine in biochemischen Analysen (Bannister und Kouzarides, 1996; Ait-Si-Ali *et al.*, 1998). So zeigten Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Kouzarides, daß eine Bindung des E1A_{12S}-Proteins an die C/H3-Domäne von CBP die HAT-Aktivität nicht beeinträchtigt (Bannister und Kouzarides, 1996). Daten von Ait-Si-Ali *et al.* (1998) konnten sogar eine Aktivierung der HAT-Aktivität von CBP durch die Bindung des E1A_{12S}-Proteins an die C/H3-Domäne nachweisen.

1.5 Koaktivatoren als Schaltstellen der E1A-vermittelten Modulation zellulärer Signaltransduktionswege: der cAMP/PKA-abhängige Signalweg

Zelluläre Signaltransduktionswege sind der Ausgangspunkt für eine koordinierte Genexpression. Die Modulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren durch zelluläre Signalketten bewirkt eine erhöhte oder erniedrigte Affinität zwischen den beteiligten Faktoren. Hierdurch kann die Zusammensetzung von Transkriptionsfaktor/Koaktivator-Komplexen an den Promotoren von Zielgenen durch zelluläre Signale reguliert werden.

Der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg, der in engem Zusammenhang mit den zellulären Koaktivatoren p300/CBP steht, stellt ein klassisches Beispiel der signalregulierten Genexpression dar. In Abwesenheit des sekundären Botenstoffes cAMP ist das Proteinkinase A (PKA)-Holoenzym ein inaktiver tetramerer Komplex, der aus zwei, als Pseudosubstrate dienenden, regulatorischen (R) und zwei katalytischen (C) Untereinheiten gebildet wird.

In den meisten Säugetierzellen kommen zwei C-Untereinheiten (als C α und C β bezeichnet) und vier R-Untereinheiten (als RI α , RI β , RII α und RII β bezeichnet) vor (als Übersicht s. Taskén *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 1990). Die beiden C-Untereinheiten sind bezüglich ihrer Substratspezifität und ihrer Affinität zu den R-Untereinheiten nahezu identisch. Im Gegensatz dazu zeigen die R-Untereinheiten sowohl Unterschiede bezüglich der Phosphorylierung durch die C-Untereinheiten, der cAMP-Affinität als auch der zellulären Lokalisation. Aufgrund dieser Heterogenität der R-Untereinheiten kommen zwei Isoformen des PKA-Holoenzym in den Zellen vor, die nach ihrer Zusammensetzung bezüglich der R-Untereinheiten als Typ-I-Holoenzym (cAKI, enthält RI α und/oder RI β) und Typ-II-Holoenzym (cAKII, enthält RII α und/oder RII β) bezeichnet werden (Beebe, 1994). Mehr als 75% der cAKII-Holoenzyme sind an subzellulären Kompartimenten wie beispielsweise dem Golgi-Apparat oder dem Centrosom durch die Interaktion mit Verankerungsproteinen, den sog. AKAPs („A-kinase anchoring proteins“), gebunden (als Übersicht s. Dell'Acqua und Scott, 1997). Dagegen scheinen die cAKI-Holoenzyme vorwiegend im Cytosol vorzuliegen, obwohl auch hier eine Bindung an subzelluläre Strukturen durch sog. dual-spezifische AKAPs (D-AKAPs) in den letzten Jahren beschrieben wurde (Skålhegg *et al.*, 1994). Die funktionelle Konsequenz der Lokalisation der verschiedenen cAK-Holoenzyme und die

unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften der R-Untereinheiten in der Transduktion des cAMP-Signals sind noch unklar. Man vermutet, daß eine Lokalisation der cAK-Holoenzyme in der Nähe der Substrate für spezifische cAMP-vermittelte zelluläre Antworten entscheidend ist (Gray *et al.*, 1998).

Durch extrazelluläre Stimuli (z. B. Wachstumsfaktoren oder Hormone) kommt es durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren zur Aktivierung der Adenylatcyclase und zur Synthese von cAMP. Aufgrund des Konzentrationsanstieges im Cytoplasma binden je zwei cAMP-Moleküle an jeweils eine regulatorische Untereinheit des PKA-Holoenzym. Hierdurch kommt es zur Freisetzung der aktiven, monomeren C-Untereinheiten. Die freigesetzten C-Untereinheiten phosphorylieren daraufhin spezifische Substratproteine im Zellkern oder Cytoplasma.

Ein entscheidender Schritt im Verständnis, wie eine Erhöhung der cAMP-Konzentration zur Aktivierung der Transkription spezifischer Gene führt, war die Identifizierung des zellulären Transkriptionsfaktors CREB (oder auch als CREB-1 bezeichnet), der an das sog. cAMP-Response-Element (CRE) cAMP-induzierbarer Gene bindet. Im Zellkern wird CREB durch die translozierte C-Untereinheit an Serin-133 phosphoryliert (Hagiwara *et al.*, 1993; Gonzalez und Montminy, 1989). Diese Phosphorylierung ermöglicht, daß CREB die zellulären Koaktivatoren p300/CBP rekrutiert, die durch ihre zahlreichen Interaktionsdomänen und ihre intrinsische Histonacetyltransferase-Aktivität für die Aktivierung cAMP/PKA-abhängiger Promotoren essentiell sind (Korzus *et al.*, 1998; Montminy, 1997). Weiterführende Untersuchungen zeigten jedoch, daß eine Rekrutierung von CBP an Phospho-CREB nicht ausreicht, um die CREB-vermittelte Transkription zu aktivieren (Chawla *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 1999). Wie Arbeiten anderer Arbeitsgruppen weiter belegten, wird durch die PKA-vermittelte Phosphorylierung des N- oder C-Terminus von CBP dessen Koaktivatorfunktion verstärkt (Chrivia *et al.*, 1993; Hu *et al.*, 1999; Kwok *et al.*, 1994). Somit scheinen im Prozeß der Aktivierung CREB-abhängiger Zielgene zwei Phosphorylierungsschritte notwendig zu sein: zum einen die Phosphorylierung von CREB an Serin-133 und zum anderen die Phosphorylierung von CBP im N- und/oder C-Terminus. Interessanterweise befindet sich die C-terminale PKA-Phosphorylierungsstelle in der HAT-Domäne von CBP (Xu *et al.*, 1998). Ob diese Phosphorylierung zu einer Aktivierung der HAT-Funktion führt, ist gegenwärtig nicht bekannt.

1.5.1 Regulation des cAMP/PKA-Signaltransduktionswegs durch die E1A-Proteine: Repression und Aktivierung

Die Modulation des cAMP/PKA-Signaltransduktionswegs durch die E1A-Proteine ist im viralen Replikationszyklus entscheidend für die Expression spezifischer zellulärer und viraler Gene. Viele adenovirale Promotoren, wie auch der im Laufe meiner Arbeit charakterisierte E2-Promotor des Adenovirus-Serotyps 12, enthalten CRE-Elemente (Fax *et al.*, 2000; als Übersicht s. Jones *et al.*, 1988). Aufgrund des Vorhandenseins von CRE-Elementen in den adenoviralen Promotoren wird die Wichtigkeit der Modulation des cAMP/PKA-abhängigen

Signaltransduktionswegs durch die E1A-Proteine verdeutlicht. Jedoch können die E1A-Proteine die cAMP/CRE-abhängige Genexpression sowohl aktivieren als auch reprimieren.

Im Falle der Repression durch die E1A-Proteine stellt man sich vor, daß die Interaktion mit p300/CBP zu einer Dissoziation dieser Koaktivatoren von dem Transkriptionsfaktor CREB führt. Durch diese Interaktion wird vermutlich die Expression CREB-abhängiger Promotoren durch das E1A_{12S}-Protein inhibiert. Dies wurde für zelluläre Promotoren wie den Somatostatin-Promotor oder den Interleukin-6-Promotor gezeigt (Arany *et al.*, 1995, Lundblad *et al.*, 1995).

Dagegen aktiviert das E1A_{12S}-Protein den humanen PCNA („proliferating cell nuclear antigen“-)Promotor über ein CRE-Promotorelement, welches von den cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktoren CREB und ATF-1 (ein cAMP/PKA-abhängiger Transkriptionsfaktor mit hoher Homologie zu CREB) gebunden wird (Lee und Mathews, 1997). Wie in diesem Fall der Aktivierungsmechanismus des PCNA-Promotors in Anwesenheit des E1A_{12S}-Proteins verläuft ist jedoch nicht geklärt. Weiterhin ist die Notwendigkeit von cAMP für die Aktivierung CRE-abhängiger Promotoren durch die E1A-Proteine bis heute unklar und in der Literatur sehr kontrovers diskutiert worden. So wurde in früheren Arbeiten gezeigt, daß eine Aktivierung adenoviraler Promotoren in Rattenzellen (PC12; Sassone-Corsi, 1988) und humanen Zellen (HepG2; Leza und Hearing, 1989) oder des zellulären c-fos-Promotors in Affenzellen (CV-1; Tan *et al.*, 1989) über CRE-Promotorelemente durch das E1A_{13S}-Protein unabhängig von einer Behandlung mit cAMP-Analoga verläuft. Daten von Lee *et al.* (1996) belegten zudem, daß der Fibronectin-Promotor durch das E1A_{12S}-Protein über eine CRE-Bindestelle in Abhängigkeit des Zelltyps, aber cAMP-unabhängig, aktiviert wird. Dagegen bewiesen andere Untersuchungen, daß das E1A_{13S}- und das E1A_{12S}-Protein den zellulären c-fos-Promotor über eine CRE-Bindestelle in Mauszellen (S49-Zellen) nur nach Behandlung mit einem cAMP-Analogen aktivieren (Gedrich und Engel, 1995 und Referenzen hierin). Wie im Falle des PCNA-Promotors sind die Mechanismen, die eine Aktivierung cAMP/CRE-abhängiger Promotoren durch die E1A-Proteine ermöglichen, bis heute nicht geklärt.

Zusammenfassend deuten die Daten darauf hin, daß E1A-Proteine funktionell mit Komponenten des cAMP-Signaltransduktionswegs interagieren. Da viele adenovirale Promotoren CRE-Elemente enthalten, sind diese Interaktionen im lytischen Entwicklungszyklus essentiell, um eine effiziente Virusvermehrung zu ermöglichen. Die Aufklärung der molekularen Mechanismen, wie E1A-Proteine eine Modulation des cAMP/PKA-abhängigen Signaltransduktionswegs und damit eine veränderte virale und zelluläre Genexpression bewirken, ist daher entscheidend für das Verständnis des viralen Replikationszyklus.

1.6 Zielsetzung

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war der von mir im Zuge meiner Diplomarbeit untersuchte E2_{Ad12}-Promotor (Fax, 1997). Hier zeigte ich, daß der E2-Promotor des Adenovirus-Serotyps 12 eine Konsensussequenz für ein cAMP-Response-Element (als E2-CRE bezeichnet) enthält, das in den Prozeß der E1A_{12S}-Protein vermittelten Aktivierung involviert ist. Die Ergebnisse dieser Analyse bildeten die Grundlage der vorliegenden Arbeit, die sich in zwei Teile gliedert:

(1) **Interaktion des Ad12 E1A_{12S}-Proteins mit Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren des cAMP/PKA-Signaltransduktionswegs**

Die cAMP/PKA-abhängigen CRE-bindenden Transkriptionsfaktoren CREB/ATF-1 und die zellulären Koaktivatoren p300/CBP stellen die entscheidenden Mediatoren des cAMP/PKA-Signaltransduktionswegs im Zellkern dar (s. Kap. 1.5). Da das E2-CRE-Element zu cAMP/PKA-induzierbaren Bindestellen zellulärer Promotoren homolog ist, sollte im ersten Teil der Arbeit untersucht werden, ob die Transkriptionsfaktoren CREB/ATF-1 und ihre assoziierten Koaktivatoren p300/CBP an der Aktivierung des viralen Promotors durch das E1A_{12S}-Protein beteiligt sind. Hier sollte insbesondere analysiert werden, ob diese Faktoren mit dem adenoviralen Protein interagieren. Nachfolgend sollte dann untersucht werden, ob und wie ihre transkriptionsinduzierende Funktion im Aktivierungsprozeß des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein moduliert wird. Zudem stellte sich die Frage, ob die von unserer Arbeitsgruppe charakterisierte, für die Ad12 E1A-Proteine spezifische, N-terminale Transaktivierungsdomäne (Lipinski *et al.*, 1997) in dem Aktivierungsprozeß über das E2-CRE des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein beteiligt ist.

(2) **Interaktion des Ad12 E1A_{12S}-Proteins mit Komponenten des PKA-Holoenzym**

Die durch die C-Untereinheit des PKA-Holoenzym vermittelte Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren CREB/ATF-1 und der Koaktivatoren p300/CBP ist für die Expression CRE-abhängiger Promotoren entscheidend. Da der E2_{Ad12}-Promotor über ein Konsensus-CRE-Promotorelement reguliert wird, lag es nahe zu vermuten, daß das E1A_{12S}-Protein die Expression des viralen Promotors möglicherweise durch eine Modulation des PKA-Holoenzym, unabhängig von cAMP, im Cytoplasma reguliert. Es stellte sich daher im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit die Frage, ob daß E1A_{12S}-Protein mit cytoplasmatisch-lokaliserten Komponenten des PKA-Holoenzym interagiert und welche funktionelle Bedeutung diese Interaktionen im Aktivierungsprozeß des E2_{Ad12}-Promotors besitzen.

2. Material

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

2.1 Chemikalien

Acetyl-CoA (Coenzym A)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Acrylamid	BioRad, München
Agarose	FMC Bioproducts, Dänemark, über Biozym, Hameln
Ampicillin	Bayer, Leverkusen
Amplify	Amersham, Braunschweig
Bacto yeast extract	Difco, Detroit, USA
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Peptide	Difco, Detroit, USA
Bacto-Tryptone	Difco, Detroit, USA
Bicine	Sigma, Deisenhofen
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma, Deisenhofen
Coomassie Brilliant Blue G250	Sigma, Deisenhofen
CSM ^{Ura-Leu} Drop-out Aminosäure-Mix	Bio 101, über Serva, Heidelberg
Deoxycholat (als Natriumsalz)	Sigma, Deisenhofen
Desoxyribonukleotide	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Fluka, Neu-Ulm
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Deisenhofen
EDTA (Ethyldiamin-N,N,N',N'-tetraacetat)	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Ethylacetat	Fluka, Neu-Ulm
Galaktose	Difco, Detroit, USA
Glucose	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Fluka, Neu-Ulm
H-89 (Isoquinolinesulfonamid-Derivat)	Biomol, Hamburg
HEPES (Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure)	Sigma, Deisenhofen
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktosid)	Biomol, Hamburg

N,N'-Methylen-bisacrylamid	Sigma, Deisenhofen
Natriumbutytrat	Sigma, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	BioRad, München
Natriumfluorid	Sigma, Deisenhofen
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
Nonidet P-40 (NP-40)	Fluka, Neu-Ulm
Pefabloc	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Polyethylenglykol (PEG) 1000	Merck, Darmstadt
Raffinose	Difco, Detroit, USA
Roscovitine	Calbiochem, Heidelberg
TEMED (N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin)	Sigma, Deisenhofen
Tris (Tris-(hydroxylmethyl)-aminomethan)	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
YNB (Yeast Nitrogen Base)	Difco, Detroit, USA

2.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase (1 U/ μ l)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Diverse Restriktionsenzyme (2-50 U/ μ l)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim Life Technologies, Eggenstein Promega, Heidelberg
Klenow-Fragment der <i>E. coli</i> DNA-Polymerase I (2 U/ μ l)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Lysozym (23000 U/mg)	Biomol, Hamburg
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	Sigma, Deisenhofen
Trypsin (Rinderpankreas, 110 U/mg)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
T4-DNA-Ligase (1 U/ μ l)	Life Technologies, Eggenstein
Proteinase K (20 U/mg)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

2.3 Peptide und Proteine

Biotinyliertes H4-Peptid (enthält die ersten 24 As des Histons H4: Biotin-[GSGS-Spacer]-SGRGKGGKGLGK GGAKRHRKVLR; Ait-Si-Ali <i>et al.</i> , 1998)	Metabion, Martinsried
---	-----------------------

Kalbsthymus-Histone (Typ IIA) Sigma, Deisenhofen

2.4 Antikörper

E: bezeichnet das Epitop, gegen den der Antikörper (AK) gerichtet ist.

Anti-ATF-1-AK (C41-5.1) (polyklonaler Kaninchen IgG AK) E: unbekannt	Santa Cruz Biochemicals, Heidelberg
Anti-acetyliertes Histon H4-AK (polyklonaler Kaninchen IgG AK) E: As 2-19 des Histons H4	Upstate Biotechnology, Waltham, USA über Biomol, Hamburg
Anti-Ad12 E1A-Antiserum (polyklonales Schaf-Antiserum) E: unbekannt	zur Verfügung gestellt von Phil Gallimore, University of Birmingham, England
Anti-ATF-1-AK (FI-1) (monoklonaler Maus IgG AK) E: unbekannt	Santa Cruz Biochemicals, Heidelberg
Anti-ATF-2-AK (C-19) (polyklonaler Kaninchen IgG AK) E: As 487-505	Santa Cruz Biochemicals, Heidelberg
Anti-CBP-AK (A-22) (polyklonaler Kaninchen IgG AK) E: As 2-22	Santa Cruz Biochemicals, Heidelberg
Anti-CBP-AK (C-20) (polyklonaler Kaninchen IgG AK) E: C-terminus	Santa Cruz Biochemicals, Heidelberg
Anti-c-Jun-AK (KM-1) (monoklonaler Maus IgG AK) E: As 56-69	Santa Cruz Biochemicals, Heidelberg
Anti-CREB-1-AK (C-21) (polyklonaler Kaninchen IgG AK) E: As 295-321, DNA-Bindedomäne	Santa Cruz Biochemicals, Heidelberg
Anti-CREB-1-AK (X-12) (monoklonaler Maus IgG AK) E: As 254-327, DNA-Bindedomäne	Santa Cruz Biochemicals, Heidelberg
Anti-CREB-Antiserum (Ab240) (polyklonaler Kaninchen IgG AK) E: α -Domäne von CREB-1 (Yamamoto <i>et al.</i> , 1990)	zur Verfügung gestellt von Marc Montminy, Joslin Diabetes Center, Boston, Massachusetts, USA

Anti-FLAG-AK (monoklonaler Maus IgG AK) E: DYKDDDDK	Sigma, Deisenhofen
Anti-Kaninchen IgG-AK Peroxidase-konjugiert	Amersham, Braunschweig
Anti-Maus IgG-AK Peroxidase-konjugiert	Calbiochem, Heidelberg
Anti-myc-Epitop (9E10)-AK (monoklonaler Maus IgG AK) E: EQKLISEEDLD	Invitrogen, Niederlande
Anti-p300-AK (C-20) (polyklonaler Kaninchen IgG AK) E: As 2395-2414	Santa Cruz, California, USA
Anti-PKA-C α -AK (C-20) (polyklonaler Kaninchen IgG AK) E: C-terminus	Santa Cruz Biochemicals, Heidelberg
Anti-RII α -AK (monoklonaler Maus IgG AK) E: N-terminus	zur Verfügung gestellt von Kjetil Taskén Institute of Medical Biochemistry, University of Oslo, Norwegen
Anti-RI α -AK (C-20) (polyklonaler Kaninchen IgG AK) E: C-terminus	Santa Cruz Biochemicals, Heidelberg
Anti-Schaf IgG-AK Peroxidase-konjugiert	Pierce, Rockford, USA; über KMF Laborchemie, St. Augustin
Normales Kaninchen IgG-Antiserum	Santa Cruz Biochemicals, Heidelberg

2.5 Nukleinsäuren

Poly [dI-dC] (Polydeoxyinosindeoxycytidil-Säure)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Heringssperma-DNA	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

2.6 Medien, Seren, Transfektionsreagenzien und Zellkulturplatten

100 x Nicht-essentielle Aminosäuren	Life Technologies, Eggenstein
6-Loch-Zellkulturschalen mit 3,5 cm Ø Vertiefungen für Transfektionen; Zellkulturplatten, -flaschen, -schalen	Becton Dickinson, New York, USA, über Oehmen, Essen

DMEM	Life Technologies, Eggenstein
Fötale Kälberserum (FKS)	Life Technologies, Eggenstein PAA, Marburg
L-Glutamin	Merck, Darmstadt
Lipofectamine	Life Technologies, Eggenstein
OPTI-MEM	Life Technologies, Eggenstein
Penicillin G (1000 U/ml)	Hoechst, Frankfurt
Polyfectin	Biontex, Martinsried
RPMI1640	Life Technologies, Eggenstein
Streptomycinsulfat	Sigma, Deisenhofen

2.7 Radioaktive Substanzen

[³⁵ S]-Methionin >37 TBq/mmol	ICN Biomedicals, Eschwege
D-Threo-[dichloracetyl-1- ¹⁴ C]- Chloramphenicol ~3,7 GBq/mmol	ICN Biomedicals, Eschwege
¹⁴ C-Acetyl-CoA ~2,4 GBq/mmol	ICN Biomedicals, Eschwege
[α- ³² P]dCTP >111 TBq/mmol (spez. Aktivität >3000 Ci/mmol)	ICN Biomedicals, Eschwege

2.8 Molekulargewichtstandards

100-bp DNA-Leiter	Life Technologies, Eggenstein
Vorgefärbte SDS-PAGE Standards, (Molekulargewichtsbereich von 10 – 220 kDa)	BioRad, München Amersham, Braunschweig

2.9 Kits

Plasmid-DNA-Maxipräparations-Kit Nucleobond AX 500	Macherey & Nagel, Düren
QIAquick Spin PCR Purification and Gelextraction Kit	Qiagen, Hilden
Super-Signal-Ultra-Chemilumineszenz- Detektionssysteme (für Western-Blot)	Pierce, Rockford, USA; über KMF Laborchemie, St. Augustin

TNT coupled Reticulocyte Lysate System (gekoppeltes <i>in vitro</i> Transkriptions/Translations-System für die Produktion von Proteinen)	Promega, Heidelberg
---	---------------------

2.10 Filme, Filter, Membranen und besondere Verbrauchsmaterialien

BioRad Bradford-Reagenz	BioRad, München
Dünnschichtchromatographie-Platten, Kieselgel, 0,2 mm Schichtdicke	Riedel-de Haen, Seelze
Elektroporationsküvetten, 0,4 mm	BioRad, München
Glutathion-Sepharose 4B	Pharmacia Biotech, Freiburg
Hybond-C-plus Nitrocellulose-Membran	Amersham, Braunschweig
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden
Poly-L-Lysin beschichtete Glasobjektträger	Sigma, Deisenhofen
Protein-A Sepharose	Pharmacia Biotech, Freiburg
Protein-A/G Sepharose	Pierce, Rockford, USA; über KMF Laborchemie, St. Augustin
Replikplatten ACCUTRAN	Schleicher & Schuell, Dassel
Röntgenfilme X-Omat AR	Kodak, Rochester, USA
Rotiszint eco plus Szintillationsflüssigkeit	Roth GmbH, Karlsruhe
Sephadex G-25-Säulen (zur Aufreinigung radioaktiv markierter Oligonukleotide)	Pharmacia Biotech, Freiburg
Slide-A-Lyzer Dialyse-Cassetten	Pierce, Rockford, USA; über KMF Laborchemie, St. Augustin
Sterivex-GS 0,22 µm Filter Unit	Millipore, Bedford, Massachusetts, USA
Whatman Filterpapier	Whatman, Maidstone, England

2.11 Spezielle Laborgeräte

Automatic TLC-Linear Analyzer	Berthold, Overath
DNA Trio Thermoblock für PCR	Biometra, München

Gene Pulser Elektroporator	BioRad, München
Laser Densitometer Ultrascan XL	Pharmacia Biotech, Freiburg

2.12 Puffer und Lösungen

Hier nicht aufgeführte Zusammensetzungen von Puffern und Lösungen wurden den Laborhandbüchern „Molecular Cloning: a laboratory manual, second edition“ (Sambrook *et al.*, 1989) und „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel *et al.*, 1997) entnommen.

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	29,2 g Acrylamid 0,8 g N,N'-Methylen-Bisacrylamid mit H ₂ O ad 100 ml
Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O
CHIP-Lyse-Puffer	50 mM HEPES/KOH pH 7,5 150 mM KCl 1 mM EDTA 0,5% NP-40 0,1% Natriumdeoxycholat
CREB/ATF-Bindungspuffer	10 mM HEPES/KOH, pH 7,9 50 mM KCl 1 mM DTT 1 mM EDTA 5% Glycerin 1 µg poly(dI-dC) 1 µg Heringssperma-DNA
dNTP-Mix (für PCR)	je 1,25 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP
Gelfixierer	50% 2-Propanol 7% Essigsäure
HAT-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA 10% Glycerin 0,05% Tween 20 10 mM Natriumbutyrat
HAT-Wasch-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 500 mM KCl 1 mM EDTA, pH 8,0 0,1% NP-40 0,5% Natriumdeoxycholat

IP+150-Puffer	50 mM HEPES/KOH pH 7.5 150 mM KCl 1 mM EDTA 10 mM NaF 1 mM Na ₃ VO ₄ 10% Glycerin 0,1% NP-40 0,5 mM Pefabloc 10 µg/ml Aprotinin
IPTG-Lösung	1 M in H ₂ O (bei -20 °C gelagert)
Kernextrakt-Puffer A	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 1,5 mM MgCl ₂ 10 mM KCl 0,5 mM DTT 0,5 mM Pefabloc
Kernextrakt-Puffer C	20 mM Tris/HCl, pH 7,5 1,5 mM MgCl ₂ 420 mM NaCl 1 mM DTT 0,5 mM Pefabloc 0,2 mM EDTA 25% Glycerin 10 mM NaF 2 mM Na ₃ VO ₄
Kernextrakt-Waschpuffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 1,5 mM MgCl ₂ 50 mM KCl 0,25 M Sucrose 0,5 mM DTT 0,5 mM Pefabloc
NB-Puffer	10 mM Bicine 150 mM NaCl
NETN-Puffer	20 mM Tris/HCl, pH 8,0 100 mM KCl 1 mM EDTA 0,5% NP-40
Ni-Elutions-Puffer	8 M Harnstoff 100 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0 300 mM KCl 10% Glycerin 500 mM Imidazol

Ni-Lyse-Puffer	6 M Guanidinhydrochlorid 100 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0 300 mM KCl 10% Glycerin 0,5% NP-40 10 mM Imidazol
Ni-Wasch-Puffer	8 M Harnstoff 100 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0 300 mM KCl 10% Glycerin 0,5% NP-40 20 mM Imidazol
PBS	4 mM MgSO ₄ 7 mM CaCl ₂ 1,4 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄
PBS ⁼	wie PBS, nur ohne MgSO ₄ und CaCl ₂
PC+150-Puffer	20 mM HEPES/KOH, pH7,9 150 mM KCl 12,5 mM MgCl ₂ 0,2 mM EDTA 0,05% NP-40 0,05% Tween 20 0,5 mM Pefabloc 2 µg/µl BSA
PEG1000, 40%	4 g PEG1000 2 ml 1 M Bicine, pH 8,35 ad 10 ml mit H ₂ O (bei -20 °C gelagert)
PS-Lösung	1,5 g Penicillin 2,5 g Streptomycinsulfat 2 g NaCl 0,1 g KCl 0,25 g Glucose 0,1 g NaHCO ₃ in H ₂ O lösen, mit NaOH auf pH 7,2 einstellen, mit H ₂ O ad 250 ml auffüllen und in 5 ml Aliquots abfüllen

Renaturierungs-Puffer 1	4 M Harnstoff 20 mM HEPES/KOH, pH 7,5 150 mM KCl 2 mM MgCl ₂ 10% Glycerin 0,005% Tween 20
Renaturierungs-Puffer 2	20 mM HEPES/KOH, pH 7,5 150 mM KCl 2 mM MgCl ₂ 10% Glycerin 0,005% Tween 20
SBEG-Puffer	1 M Sorbitol 10 mM Bicine, pH 8,35 3% (v/v) Ethylenglykol
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 0,4% SDS
SDS-PAGE-Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 0,4% SDS
SDS-PAGE-Laufpuffer (1 x)	25 mM Tris/HCl, pH 8,3 250 mM Glycin 0,1% SDS
SDS-Probenpuffer (6 x)	0,3 M Tris/HCl pH 6,8 0,6 M DTT 12% SDS 60% Glycerin 0,6% Bromphenolblau
TBS	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
TBS-T	TBS mit 0,1% Tween 20
Transferpuffer (für Western Blot)	48 mM Tris 39 mM Glycin 0,037% (w/v) SDS 20% Methanol
VT-Lösung	0,5 M EDTA 2,5 g/l Trypsin in PBS ⁼

YNB(-)-Galaktose	wie YNB-(+)-Galaktose, nur ohne Galaktose
YNB-(+)-Galaktose	0,85 g YNB (ohne As, ohne (NH ₄) ₂ SO ₄) 2,5 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 15 g Galaktose 10 g D(+)-Raffinose 10 g Glycerin 8 g Bacto-Agar 0,34 g CSM ^{-Ura-Leu} Drop-out Aminosäure-Mix ad 500 ml mit H ₂ O und 30 min bei 1 bar autoklavieren
YNB-(+)-Glucose	0,85 g YNB (ohne As, ohne (NH ₄) ₂ SO ₄) 2,5 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 10 g D(+)-Glucose 10 g D(+)-Raffinose 8 g Bacto Agar 0,34 g CSM ^{-Ura-Leu} Drop-out Aminosäure-Mix ad 500 ml mit H ₂ O und 30 min bei 1 bar autoklavieren
YPD-Medium	10 g Bacto-yeast extract 10 g Bacto-Peptide 20 g Glucose ad 1 l mit H ₂ O und 30 min bei 1 bar autoklavieren

2.13 Bakterienstämme

E. coli K12 DH5 α [*supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* M15) *hsdR* 17 *recA1* *endA1* *gyrA96*, *thi1* *relA1*] ist ein rekombinationsdefekter Bakterienstamm zur Vermehrung von Derivaten der pUC-Plasmide (bezogen von Life Technologies, Eggenstein).

E. coli K12 BL21 (F⁻, *ompT*, *hsdS* (*r_B*⁻, *m_B*⁻), *gal*) ist ein Protease-defizienter Bakterienstamm zur Expression von Fusionsproteinen (bezogen von Pharmacia Biotech, Freiburg).

E. coli K12 M15[pREP4] (*Nal*^S, *Str*^S, *Rif*^S, *lac*⁻, *Ara*⁻, *Gal*⁻, *mtl*⁻, F⁻, *RecA*⁺, *Uvr*⁺, *Lon*⁺) besitzt das pREP4-Plasmid, welches konstitutiv das lac-Repressorprotein exprimiert und hierdurch eine strikt IPTG-induzierbare Expression des rekombinanten Proteins von z. B. den pQE-Plasmiden ermöglicht (bezogen von Qiagen, Hilden).

pYes2-MYR	Hefe-Expressionsvektor (Uracil [Ura]-Selektion), der die klonierten cDNAs als Fusionsproteine mit einer N-terminalen <i>v-src</i> Myristylierungssequenz exprimiert (Aaronheim <i>et al.</i> , 1997), zur Verfügung gestellt von H. Hennemann, Institut für Zellbiologie, Uniklinikum Essen
pADNS-SOS	Hefe-Expressionsvektor (Leucin [Leu]-Selektion), der die klonierten cDNAs als Fusionsproteine mit einem C-terminalen SOS-Anteil exprimiert (Aaronheim <i>et al.</i> , 1997), zur Verfügung gestellt von H. Hennemann, Institut für Zellbiologie, Uniklinikum Essen
pcDNA3.1-myc/his	eukaryontischer Expressionsvektor, der die klonierten cDNAs als Fusionsproteine mit einem C-terminalen myc- und his-Epitop exprimiert, Invitrogen, Niederlande
PCR3.1	eukaryontischer Expressionsvektor, Invitrogen, Niederlande

2.17 Zur Verfügung gestellte Plasmide

pBL-CAT3	basaler CAT-Reporter-Gen-Vektor, Luckow und Schütz (1987)
G5-E1BTATA-CAT	enthält fünf Gal4-Bindestellen sowie die Ad2 E1B-TATA-Box vor dem CAT-Reporter-Gen, zur Verfügung gestellt von R. Bernards, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande
phc-jun(-1600/+740)-CAT	enthält den humanen c-jun-Promotor von nt-1600 bis +740, zur Verfügung gestellt von A. J. van der Eb, Laboratory for Molecular Carcinogenesis, Sylvius Laboratories, University of Leiden, Niederlande
pRc/RSV-CBP	kodiert für das CREB-Bindeprotein (CBP), zur Verfügung gestellt von R. Goodman, Vollum Institute, Oregon Health Sciences University, Portland, USA

pRc/CMV-A-CREB	kodiert für den dominant-negativen Inhibitor A-CREB, zur Verfügung gestellt von C. Vinson, Laboratory of Biochemistry, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
RSV-CHO-PKA-C α	exprimiert die katalytische Untereinheit C α der PKA, zur Verfügung gestellt von R. A. Maurer, Department of Cell and Developmental Biology, School of Medicine, Oregon Health Sciences University, Portland, USA
pRc/RSV-CREB	kodiert für das cAMP-Response-Element (CRE) Bindeprotein CREB (oder auch als CREB-1 bezeichnet), zur Verfügung gestellt von M. R. Montminy, Joslin Diabetes Center, Boston, Massachusetts, USA
pGEM-ATF-1	kodiert für den "Activating transcription factor 1", CRE-Bindeprotein, zur Verfügung gestellt von G. Schuetz, Division Molecular Biology of the Cell 1, German Cancer Research Center, Heidelberg
pRc/RSV-PKI	exprimiert den spezifischen Proteinkinase-Inhibitor (PKI) der PKA-C α , zur Verfügung gestellt von R. A. Maurer, Department of Cell and Developmental Biology, School of Medicine, Oregon Health Sciences University, Portland, USA
CMV β -p300	exprimiert p300, zur Verfügung gestellt von D. Livingston, Dana-Farber Institute and Harvard Medical School, Boston, USA
GST-CBP ₁₋₁₈₉₀ und GST-CBP ₁₋₁₆₉₀	kodieren für C-terminale CBP-Deletionsmutanten, zur Verfügung gestellt von A. Harel-Bellan, Laboratoire Oncogénèse, Différenciation et Transduction du Signal, Villejuif, Frankreich

pBS-RII α	exprimiert die regulatorische Untereinheit RII α des cAKII-Holoenzym, zur Verfügung gestellt von K. Taskén, Institute of Medical Biochemistry, University of Oslo, Norwegen
pBS-RI α	exprimiert die regulatorische Untereinheit RI α des cAKI-Holoenzym, zur Verfügung gestellt von K. Taskén, Institute of Medical Biochemistry, University of Oslo, Norwegen
pcDNA3.1-Ht31	exprimiert die As 418-718 des humanen Schilddrüsen-Verankerungsproteins Ht31 einschließlich der RII-Bindedomäne von As 493-515 (Lester <i>et al.</i> , 1997), zur Verfügung gestellt von K. Taskén, Institute of Medical Biochemistry, University of Oslo, Norwegen
pcDNA3.1-Ht31-P	Ht31-P enthält einen Aminosäureaustausch an Position 502 von Serin nach Prolin in der RII-Bindedomäne des humanen Schilddrüsen-Verankerungsproteins Ht31 (Lester <i>et al.</i> , 1997), zur Verfügung gestellt von K. Taskén, Institute of Medical Biochemistry, University of Oslo, Norwegen
pCMV-HA-HDAC-1	kodiert für die Histondeacetylase-1 (HDAC-1), zur Verfügung gestellt von A. Harel-Bellan, Laboratoire Oncogénèse, Différenciation et Transduction du Signal, Villejuif, Frankreich
pRc/RSV-AKAP149	exprimiert die RI- und RII-Interaktionsdomäne des dual-spezifischen AKAP149 von As 326-425, zur Verfügung gestellt von K. Taskén, Institute of Medical Biochemistry, University of Oslo, Norwegen

2.18 Oligonukleotide

Die hier aufgelisteten Oligonukleotide wurden von der MWG Biotech GmbH (Ebersberg) oder Metabion (Martinsried) synthetisiert, entsalzt und lyophilisiert. Die Oligonukleotide wurden in H₂O aufgenommen (Endkonzentration der Stammlösung je 100 pmol/μl). Modifikationen oder zusätzlich synthetisierte Nukleotide (z. B. Restriktionsschnittstellen) in den aufgeführten Oligonukleotiden sind in Klammern gesetzt.

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')
3' Ad12 E1A, Ad12-Genom nt 1374 ohne Stop	(CGGGATCC)ATTACATCTAGGGCGTTTCACTGAC
3' E2 _{Ad12} , Ad12-Genom nt 25481, <u>pmTATA</u> (Punktmutationen in der TATA-Box des E2 _{Ad12} (140bp)-Promotors)	(CGGGATCCT)GTTCAA <u>AAAAAA</u> ACTGCTCCCTCTC
3' E2 _{Ad12} , Ad12-Genom nt 25501	(CGGGATCC)CTTGCAGGACGCAGAAGCTC
3' RIIα, nt 1404 Stop	(TTTCCCGGG)TCACTACTGCCCGAGGTTGCCAG
3' RIα, nt 1249, Stop	(TTTCCCGGG)TCATTATCAGACAGACAGTGACA CAA <u>AACTGTT</u>
3' Ad12 E1A, Ad12-Genom nt 1374, 2x Stop	(CCCAAGCTT)TTATCAATTACATCTAGGGCGTTT CACTG
5' Ad12 E1A, Ad12-Genom nt 502, <u>DA16</u> (Punktmutationen führen zum As-Austausch an Position 16 im E1A-Protein von Asp nach Ala)	(CCCAAGCTT)ATGAGA <u>ACTGAAATGACTCCCTT</u> GGTCCTGTCGTATCAGGAAGCT <u>GCCGACATATT</u>
5' Ad12 E1A, Ad12-Genom nt 502, <u>DA24</u> (Punktmutationen führen zum As-Austausch an Position 24 im E1A-Protein von Asp nach Ala)	(CCCAAGCTT)ATGAGA <u>ACCGAAATGACTCCCTT</u> GGTCCTGTCGTATCAGGAAGCTGACGACATATT GGAGCATT <u>TGGTGCCAACTTTTTT</u>
5' Ad12 E1A, Ad12-Genom nt 502, <u>IP18</u> (Punktmutationen führen zum As-Austausch an Position 18 im E1A-Protein von Ile nach Pro)	(CCCAAGCTT)ATGAGA <u>ACTGAAATGACTCCCTT</u> GGTCCTGTCGTATCAGGAAGCTGACGAC <u>CCATT</u> GGAGCATT <u>TGAAC</u>
5' Ad12 E1A, Ad12-Genom nt 502, <u>LS19</u> (Punktmutationen führen zum As-Austausch an Position 19 im E1A-Protein von Leu nach Ser)	(CCCAAGCTT)ATGAGA <u>ACTGAAATGACTCCCTT</u> GGTCCTGTCGTATCAGGAAGCTGACGACAT <u>ATC</u> <u>GGAGCATTG</u>
5' Ad12 E1A, Ad12-Genom nt 502, <u>RG2</u> (Punktmutationen führen zum As-Austausch an Position 2 im E1A-Protein von Arg nach Gly)	(CCCAAGCTT)ATG <u>GGCACTGAAATGACTCCCTT</u> GGTC
5' Ad12 E1A, Ad12-Genom nt 502, wt	(CCCAAGCTT)ATGAGA <u>ACTGAAATGACTCCCTT</u> GGTC
5' Ad12 E1A, Ad12-Genom nt 589, ΔN + ATG (führt zur Deletion der As 1-29 im E1A-Protein)	(CGGGATCC)ATGGTACCCAGTGATGATGATCTTT
5' Ad12 E1A, Ad12-Genom nt 739, Δ1-79 (führt zur Deletion der As 1-79 im E1A-Protein)	(CCCAAGCTT)ATGCCGGAGCCTCCTGTACTTTCT CCT
5' E2 _{Ad12} , Ad12-Genom nt 25598, ΔE2F (Deletion der E2-E2F-Sequenz im E2 _{Ad12} (140bp)-Promotor)	(CGGGATCC)TGACGTCATGTTGAAAGTCGCGCG CGGGCTTT

5' E2 _{Ad12} , Ad12-Genom nt 25608, Δ CRE (Deletion des E2-CREs im E2 _{Ad12} (140bp)-Promotors)	(CGGGATCC)CTTTTCCCGCCTGTTGAAA
5' E2 _{Ad12} , Ad12-Genom nt 25641, (für E2 _{Ad12} (140bp)-Promotor)	(CGGGATCC)GTAAGGCGTGGGAATATCTTT
5' E2 _{Ad12} , Ad12-Genom nt 25641, <u>pmCRE</u> (Punktmutationen im E2-CRE des E2 _{Ad12} (140bp)- Promotors)	(CGGGATCC)GTAAGGCGTGGGAATATCTTTACT TCATCTTGTGTGA <u>AT</u> TCACTTTTCC
5' E2 _{Ad12} , Ad12-Genom nt 25641, <u>pmE2F</u> (Punktmutationen in der E2-E2F-Sequenz des E2 _{Ad12} (140bp)-Promotors)	(CGGGATCC)CGTAAGGCGTGGGAATATCTTTAC TTCATCTTGTGTGACGTCAC <u>TTTCCATA</u> CTGTT GAA
5' E2 _{Ad12} , Ad12-Genom nt 25716 (für E2 _{Ad12} (215bp)-Promotor)	(CCGGGATCC)GCTTAACCAATTCATTTTGCTAGA
5' E2 _{Ad12} , Ad12-Genom nt 25825 (für E2 _{Ad12} (324bp)-Promotor)	(CGGGATCC)TGATATATCAGGGCAGCTGGCCAA G
5' E2 _{Ad12} , Ad12-Genom nt 25890 (für E2 _{Ad12} (389bp)-Promotor)	(CGGGATCC)GGCGTCGCGAGGCAAAAGTACA
5' E2 _{Ad12} , Ad12-Genom nt 25927 (für E2 _{Ad12} (420bp)-Promotor)	(CGGGATCC)CCGCAAGCTGTGCCCCAGCGT
5' RII α , nt 190, ATG der RII α -Untereinheit	(TTTCCCGGG)ATGAGCCACATCCAGATCCCG
5' RII α , nt 463, As Δ 1-91 (führt zur Deletion der As 1-91 in der RII α - Untereinheit)	(TTTCCCGGG)AGCAGATTTAATAGACGAGTA
5' RI α , nt 104, ATG der RI α -Untereinheit	(TTTCCCGGG)ATGGAGTCTGGCAGTACCGCCGC C
5' RI α , nt 377, As Δ 1-91 (führt zur Deletion der As 1-91 in der RI α - Untereinheit)	(TTTCCCGGG)AAAGGTAGGAGGCGACGAGGT
c-jun2-TRE des humanen c-jun-Promotors (nt -194 bis nt -178), van Dam <i>et al.</i> , 1993	AGCATTACCTCATCCCG
CRE-Som, CRE-Element des Ratten-Somatostatin- Promotors (nt -60 bis nt -29), Montminy <i>et al.</i> , 1986	CGCCTCCTTGGCTGACGTCAGAGAGAGAGTTT
E2-CRE des E2 _{Ad12} (140bp)-Promotors (nt -105 bis nt -84)	(GGG)TTGTTGTGACGTC <u>ACTTTTCC</u>
E2-CRE-Element des E2 _{Ad12} (140bp)-Promotors (nt -113 bis nt -80), mit Biotin und C ₂₄ -Spacer	(Biotin-C ₂₄ -)TACTCATCTTGTGTGACGTC <u>ACT</u> TTTCCCGCC-3'.
Mut-CRE-Som, punktmultiertes CRE-Element des Ratten-Somatostatin-Promotors (nt -60 bis nt -29), Montminy <i>et al.</i> , 1986	CGCCTCCTTGGCTGAA <u>TTT</u> CAGAGAGAGAGTTT

3. Methoden

3.1 Allgemeine Methoden

Grundlegende molekularbiologische Arbeitsmethoden, die hier nicht gesondert aufgeführt sind, wurden den Laborhandbüchern „Molecular Cloning: a laboratory manual, second edition“ (Sambrook *et al.*, 1989) und „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel *et al.*, 1997) entnommen.

Die Arbeiten mit Säugerzellen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Lösungen und Materialien wurden bei 121 °C und 1 bar autoklaviert, Lösungen mit hitzeempfindlichen Komponenten wurden sterilfiltriert. Alle Arbeiten mit Bakterien, Nukleinsäuren und Proteinen wurden, wenn nicht anders aufgeführt, unter Eiskühlung der Proben durchgeführt.

Die Aufreinigung PCR-amplifizierter oder restringierter DNA, synthetisch hergestellter Doppelstrang-Oligonukleotide sowie die Isolierung von DNA aus Agarose erfolgte mit dem gekoppelten „QIAquick Spin PCR Purification and Gelextraction“-Kit der Firma Qiagen. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im quantitativen Maßstab erfolgte mit dem Plasmid-DNA-Maxipräparations-Kit Nucleobond AX 500 gemäß den Angaben der Firma Macherey & Nagel. Die Plasmid-DNA-Maxipräparation beruht hierbei auf einer optimierten Form der alkalischen Lyse-Methode nach Birnboim und Doly (1979). Alle innerhalb dieser Arbeit benötigten DNA-Sequenzierungen wurden mit dem „AutoRead-Sequencing“-Kit auf einem ALF (Automated Laser Fluorescent)-DNA-Sequenzierer nach Angaben des Herstellers Pharmacia Biotech oder bei der Sequenzierfirma Seqlab GmbH (Göttingen) durchgeführt.

3.2 Zellkultur

Die adhärennten Zelllinien KB, COS7 und HEK12 wurden bei 37 °C im Brutschrank in 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Als Medium diente DMEM, dem auf 500 ml ergänzend 10% fötales Kälberserum (FKS), 1,5% 100 x nicht-essentielle Aminosäuren, 1,5% einer 2 mM L-Glutamin-Lösung und jeweils 100 µg/ml der Antibiotika Penicillin und Streptomycin zugesetzt wurden (als DMEM-Vollmedium bezeichnet). Für alle routinemäßigen Zellkulturarbeiten wurden die verwendeten Lösungen auf 37 °C vorgewärmt. Für das Passagieren konfluent (80-90%) gewachsener Zellen wurden diese einmal mit PBS⁻ (s. Kap. 2.12) gewaschen und dann mittels VT-Lösung von der Zellkulturoberfläche gelöst. Die abgelösten Zellen wurden in DMEM-Vollmedium resuspendiert und von dieser Zellsuspension im Verhältnis 1:5 bis 1:10 auf neue Zellkulturflaschen ausgesät. Zum Anlegen von Zellstocks wurden die Zellen (50% Konfluenz) wie oben beschrieben behandelt. Die Zellsuspension wurde anschließend abzentrifugiert (1 min, 600 x g, RT), in 2-3 ml Einfriermedium (DMEM-Vollmedium mit 20% FKS und 10% DMSO) resuspendiert und als 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden dann mit Zellstoff umwickelt, 24 h bei -80 °C aufbewahrt und danach in Flüssigstickstoff gelagert.

3.3 Transfektion eukaryontischer Zellen

Die Transfektion eukaryontischer Zellen erfolgte mittels liposomaler Transfektionsreagenzien (Lipofektion, s. Kap. 3.3.1) oder durch Elektroporation (s. Kap. 3.3.2).

3.3.1 Lipofektion

Die Transfektion eukaryontischer Zellen unter Verwendung der liposomalen Transfektionsreagenzien Lipofectamine und Polyfectin erfolgte gemäß den Angaben der Hersteller. Für die Transfektion wurden in einer 6-Loch-Zellkulturschale 2 bis $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Loch ($9,6 \text{ cm}^2$) in 2 ml DMEM-Vollmedium 18 bis 24 h vor Transfektionsbeginn ausgesät. Der Transfektionsansatz wurde für 6 bis 8 h auf den Zellen belassen, anschließend durch DMEM-Vollmedium ersetzt und wie in Kap. 3.2 beschrieben kultiviert. Die Zellen wurden 24 bis 48 h später geerntet.

Für Immunpräzipitationen (s. Kap. 3.6.6) und Immunfluoreszenz-Untersuchungen (s. Kap. 3.6.7) wurden 8×10^5 Zellen (aufgeteilt auf vier Löcher einer 6-Loch-Zellkulturschale) mit 10 μl Polyfectin und 1,5 μg DNA pro Loch transfiziert. 24 h nach Transfektionsbeginn wurden die transfizierten Zellen einmal mit PBS⁻ (s. Kap. 2.12) gewaschen und von der Zellkulturoberfläche mittels VT-Lösung gelöst. Die abgelösten Zellen von vier Löchern wurden in DMEM-Vollmedium aufgenommen und abzentrifugiert (78 x g, RT, 2 min). Das Zellpellet wurde in DMEM-Vollmedium resuspendiert, die Zellen auf eine 78 cm^2 -Zellkulturschale ausgesät und für weitere 24 h bis 48 h inkubiert (s. Kap. 3.2).

3.3.2 Elektroporation

Um eine erhöhte Transfektionseffizienz zu erreichen, wurden COS7-Zellen nach einer modifizierten Methode von Melkonyan *et al.* (1996) elektroporiert. Hierzu wurden $9,2 \times 10^6$ Zellen mit 15 μg der zu transfizierenden DNA in 400 μl Elektroporationspuffer (RPMI1640-Medium mit 10 mM Glucose, 0,1 mM DTT und 1,25% DMSO) vermischt, blasenfrei in Elektroporationsküvetten überführt und für 1 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 250 V und 960 μF für 2 s elektroporiert. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit bei RT wurden die transfizierten Zellen in DMEM-Vollmedium, das zusätzlich 1,25% DMSO enthielt, auf 78 cm^2 -Zellkulturschalen ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen auf neue 78 cm^2 -Zellkulturschalen passagiert und für weitere 24 h in DMEM-Vollmedium kultiviert.

3.4 Bestimmung der CAT-Aktivität in Zellextrakten

Die Bestimmung der CAT-Aktivität transient transfizierter eukaryontischer Zellen erfolgte nach Brockmann *et al.* (1996). Zur Bestimmung der CAT-Aktivität wurden 30 μg Gesamtzellextrakt, 2 μl [¹⁴C]-Chloramphenicol, 25 μl einer 4 mM Acetyl-CoA-Lösung (in

0,25 M Tris/HCl, pH 7,5) gemischt und mit 0,25 M Tris/HCl, pH 7,5 das Probenvolumen auf 150 μ l eingestellt. Der Ansatz wurde zwischen 15 min bis 2 h bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Chromatographie zur Auftrennung des acetylierten Chloramphenicols erfolgte auf Dünnschichtchromatographieplatten für 45 min in einer dampfdruckgesättigten DC-Kammer. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Chloroform:Methanol (Verhältnis 19:1). Nach Trocknung der Dünnschichtchromatographieplatte wurde die Quantifizierung des [¹⁴C]-markierten Chloramphenicols (und somit der CAT-Aktivität) mit dem „Automatic TLC-Linear Analyzer“ der Firma Berthold durchgeführt.

3.5 Präparation von Cytoplasma- und Kernextrakten

Die Präparation von Cytoplasma- und Kernextrakten erfolgte nach einer modifizierten Methode von Dignam *et al.* (1983). Die Zellen wurden hierfür auf Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von 70 bis 80% kultiviert. Nach Erreichen dieser Konfluenz wurden die Zellen mit PBS⁻ (s. Kap. 2.12) gewaschen, mittels eines Gummischabers von der Zellkulturschale gelöst und für 10 min bei 600 x g, 4 °C abzentrifugiert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten bei 4 °C. Das Zellpellet wurde in dem 3-5-fachen Zellvolumen Kernextrakt-Puffer A (s. Kap. 2.12) resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Hiernach erfolgte der Zellaufschluß der Zellen mit etwa 10 bis 30 Hüben in einem Dounce-Homogenisator, wobei der Zellaufschluß unter einem Phasenkontrastmikroskop überprüft wurde. Anschließend wurden die freigesetzten Zellkerne für 10 min bei 600 x g abzentrifugiert. Der Überstand (Cytoplasmaextrakt) wurde abgenommen, kurz ultraschallbehandelt und für 30 min bei 51700 x g zentrifugiert. Der Cytoplasmaextrakt wurde, nach der Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem Bradford-Reagenz, bei -80°C gelagert.

Das Zellkernpellet wurde zweimal in Kernextrakt-Waschpuffer (s. Kap. 2.12) vorsichtig resuspendiert und sofort für 10 min bei 600 x g zentrifugiert. Das Zellkernpellet wurde danach in Kernextrakt-Puffer C (30 μ l Kernextrakt-Puffer C pro 2×10^6 Zellen, s. Kap. 2.12) homogenisiert und anschließend für 60 min gemischt. Danach wurde für 30 min bei 51700 x g zentrifugiert und die Proteinkonzentration des Überstandes (Kernextrakt) mit dem Bradford-Reagenz bestimmt. Die Kernextrakte wurden anschließend aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.6 Protein-Protein-Interaktionsanalysen

3.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in Polyacrylamidgelen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen im diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli (Laemmli, 1970). Die Trenngele (im Bereich von 6-18%, C-Wert: 2,7%) und Sammelgele (5%, C-Wert: 2,7%) wurden nach Sambrook *et al.* (1989) angefertigt. Die Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer (Endkonzentration: 1 x SDS-

Probenpuffer, s. Kap. 2.12) vermischt und für 5 min gekocht. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer Mini-Protean-II-Dual SLAB-Kammer (BioRad, München). Nach dem Gellauf wurden die separierten Proteine durch Coomassie-Färbung oder nach Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran immunologisch (s. Kap. 3.6.5) detektiert. Radioaktiv markierte Proteine wurden nach Fluorographie des Gels (s. Kap. 3.7.2) und Exposition gegen einen Röntgenfilm nachgewiesen.

3.6.2 Aufreinigung des HIS₆-E1A_{12S}-Proteins über Ni-NTA-Metall-Affinitätschromatographie

3.6.2.1 Aufreinigung des HIS₆-E1A_{12S}-Proteins unter denaturierenden Bedingungen

Die Aufreinigung des E1A_{12S}-Proteins als (6x)-Histidin-Fusionsprotein (HIS₆-E1A_{12S}) aus bakteriellem Extrakt erfolgte durch Nickel-Affinitätschromatographie über Ni-NTA-Agarose. Hierfür wurde der prokaryontische Expressionsvektor pQE-8-HIS₆-E1A_{12S}, welcher die E1A_{12S}-cDNA nach Induktion mit IPTG als HIS₆-E1A_{12S}-Fusionsprotein exprimiert, in Bakterien des *E. coli* Stammes M15[pREP4] transformiert. Für die anschließende Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen wurde ein Einzelklon der transformierten Bakterien in 20 ml Selektions-LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin) inokuliert und über Nacht bei 37 °C geschüttelt (200 rpm). Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur im Verhältnis 1:50 mit Selektions-LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin) verdünnt und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,6 (OD₆₀₀) inkubiert (37 °C, 200 rpm).

Nach Erreichen der OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Expression des HIS₆-E1A_{12S}-Proteins durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zum LB-Medium für 2 h induziert. Nach dem Induktionsende wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet (10 min, 2200 x g, 4 °C), in 5 ml Ni-Lyse-Puffer (s. Kap. 2.12) pro g Bakterienpellet resuspendiert und für 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde bei 10000 x g, RT für 30 min zentrifugiert und 1 ml Ni-NTA-Agarose (äquilibriert in Ni-Lyse-Puffer) zu je 4 ml des Lysats gegeben. Die Bindung des HIS₆-E1A_{12S}-Proteins an die Ni-NTA-Agarose erfolgte für 1 h bei RT auf einem Schüttelrad. Dann wurde das Lysat-Ni-NTA-Agarose Gemisch auf eine Säule gegeben, absetzen lassen und zweimal mit 4 ml Ni-Wasch-Puffer (s. Kap. 2.12) gewaschen. Die Elution des HIS₆-E1A_{12S}-Proteins erfolgte viermal in Ni-Elutions-Puffer (s. Kap. 2.12). Zur Bestimmung des Elutionsprofils wurden 10 µl eines jeden Eluats mit 6 x SDS-Puffer für 5 min gekocht, auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und das Protein durch Coomassie-Färbung detektiert.

3.6.2.2 Renaturierung des HIS₆-E1A_{12S}-Proteins

Die Renaturierung des HIS₆-E1A_{12S}-Proteins erfolgte durch eine stufenweise Reduktion der Harnstoffkonzentration (über 4 M, 2 M, 1 M, 0,5 M und 0 M Harnstoff) mittels Dialyse. Für

die Dialyse wurde das Eluat in eine „Slide-A-Lyzer-Dialyse“-Cassette, die zuvor für 3 min mit 21% Glycerin äquilibriert wurde, überführt und anschließend gegen Renaturierungspuffer 1 (s. Kap. 2.12) für 1 h bei 4 °C dialysiert. Danach wurde durch Verdünnung mit Renaturierungspuffer 2 (s. Kap. 2.12) schrittweise gegen die erforderliche Harnstoffkonzentration unter langsamen Rühren für 2 h bei 4 °C dialysiert, wobei der letzte Dialyseschritt gegen Renaturierungspuffer 2 über Nacht bei 4 °C erfolgte. Danach wurde die Proteinkonzentration des HIS₆-E1A_{12S}-Proteins mit dem Bradford-Reagenz bestimmt, das Protein aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.6.3 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Die Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase (GST)-gekoppelten Fusionsproteinen aus bakteriellem Extrakt erfolgte durch Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose 4B. Hierfür wurden prokaryontische Expressionsvektoren des pGEX-Systems, welche nach Induktion mit IPTG die entsprechenden cDNAs als Fusionsproteine mit einer N-terminal gekoppelten GST-Domäne aus *Schistosoma japonicum* exprimieren, in Bakterien des *E. coli* Stammes BL21 transformiert. Für die anschließende Aufreinigung unter nativen Bedingungen wurde ein Einzelklon der transformierten Bakterien in 100 ml Selektions-LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) inokuliert und über Nacht bei 37 °C geschüttelt (200 rpm). Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur im Verhältnis 1:50 mit Selektions-LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 1 inkubiert (37 °C, 200 rpm).

Nach Erreichen dieser OD₆₀₀ wurde die Expression des GST-Fusionsproteins durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 100 mM zum LB-Medium für 2 h induziert. Nach dem Induktionsende wurden die Bakterien für 10 min bei 2200 x g durch Zentrifugation geerntet und in 10 ml NETN-Puffer (s. Kap. 2.12) resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte durch Zugabe von 1 ml einer 10 mg/ml Lysozymlösung pro ml Bakteriensuspension für 30 min bei 4 °C und einer anschließenden Ultraschallbehandlung (sechsmal für je 10 s, Stufe 5). Danach wurde bei 6200 x g, 4 °C für 20 min zentrifugiert und das Lysat mit 300 µl Glutathion-Sepharose (äquilibriert in NETN-Puffer) vermischt. Die Bindung der GST-Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose erfolgte für 1 h bei 4 °C auf einem Schüttelrad. Dann wurde das Lysat-Glutathion-Sepharose Gemisch abzentrifugiert (78 x g, 1 min, 4 °C) und dreimal mit 5 ml NETN-Puffer gewaschen. Die an Glutathion-Sepharose immobilisierten Fusionsproteine wurden abschließend in 200 µl NETN-Puffer resuspendiert. Danach wurde die Proteinkonzentration der GST-Fusionsproteine mit dem Bradford-Reagenz bestimmt, das Fusionsprotein aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Zur qualitativen Bestimmung der Aufreinigung des GST-Fusionsproteins wurden 10 µg des Fusionsproteins in 30 µl 1 x SDS-Puffer für 5 min gekocht, auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung detektiert.

Die Elution nativer GST-Fusionsproteine von der Glutathion-Sepharose durch reduziertes Glutathion erfolgte nach den Angaben des Herstellers Pharmacia Biotech.

3.6.4 GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen

Für GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen mit *in vitro* translatierten, ^{35}S -markierten Proteinen wurden zwischen 1 bis 25 μg der entsprechenden, an Gluthation-Sepharose immobilisierten, GST-Fusionsproteine mit 1×10^5 cpm eines *in vitro* translatierten, ^{35}S -markierten Proteins inkubiert. Die Bindungsreaktionen erfolgten in 500 μl PC+150-Puffer (s. Kap. 2.12) für 1 h bei RT. Hiernach wurden die über Gluthation-Sepharose immobilisierten Fusionsprotein-Protein-Komplexe abzentrifugiert (78 x g, 1 min, 4 °C) und fünfmal mit je 1 ml PC+150-Puffer gewaschen. Die Protein-Komplexe wurden anschließend in 30 μl 1 x SDS-Puffer für 5 min gekocht und auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurde das Gel wie in Kap. 3.7.2 beschrieben behandelt.

GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen mit bakteriell aufgereinigten rekombinanten Proteinen wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Interagierende Proteine wurden anschließend mittels Immunoblot-Analysen mit spezifischen Antikörpern detektiert (s. Kap. 3.6.5).

3.6.5 Western-Blot

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden diese wie in Kap. 3.6.1 beschrieben gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond C-extra) überführt, die zuvor durch kurzes Waschen in H_2O und einer nachfolgenden zehnmütigen Äquilibrierung in Transferpuffer (s. Kap. 2.12) aktiviert wurde. Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte anschließend für 60 bis 90 min (RT) bei einer Stromstärke von $1,6 \text{ mA/cm}^2$ mit der „Semi-Dry-Blot“ Apparatur (BioRad).

Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulose-Membran zweimal für 5 min in 1 x TBS (s. Kap. 2.12) gewaschen. Die Membran wurde anschließend für 1 h mit TBS-T/10% Milchpulver bei RT blockiert und danach in derselben Lösung für 1-2 h mit dem Primärantikörper (Verdünnung 1:250 bis 1:5000, je nach Antikörper) inkubiert. Nach einem Waschvorgang (dreimal für 10 min in TBS-T) wurde die Membran mit einem sekundären, Meerrettich-Peroxidase konjugierten Antikörper, der gegen den F_c -Anteil des Primärantikörpers gerichtet war, für 1 h in TBS-T/1% Milchpulver (Verdünnung 1:2000 bis 1:150000, je nach Hersteller) bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang (dreimal für 10 min TBS-T und zweimal für 5 min in TBS) erfolgte der Nachweis der Antikörperkomplexe mit dem Super-Signal-Ultra-Chemilumineszenz-Detektionssystem nach Angaben des Herstellers Pierce.

Sollte die Membran mehreren Antikörperreaktionen unterzogen werden, wurden die bestehenden Antigen-Antikörperkomplexe durch Inkubation in TBS-T/0,2% SDS für 45 min bei 70 °C unter leichtem Schütteln dissoziiert. Danach wurde die Membran kurz in TBS gewaschen und einer erneuten Antikörperreaktion unterzogen.

3.6.6 Immunpräzipitationen

Für Immunpräzipitationen wurden COS7-Zellen durch Lipofektion oder Elektroporation transient transfiziert (s. Kap. 3.3). 48 bis 72 h nach Transfektionsbeginn wurden die Zellen mit PBS⁻ (s. Kap. 2.12) gewaschen, mittels eines Gummischabers von der Zellkulturschale gelöst und bei 600 x g, 4 °C abzentrifugiert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten bei 4 °C. Das Zellpellet wurde in IP+150-Puffer (s. Kap. 2.12) resuspendiert und für 30 min geschüttelt. Der Gesamtzellextrakt wurde anschließend für 20 min bei 51700 x g zentrifugiert und die Proteinkonzentration des Überstandes mit dem Bradford-Reagenz bestimmt.

Die für die Immunpräzipitationen benötigte Protein-Sepharose wurde zweimal mit 1 ml IP+150-Puffer gewaschen und anschließend für 4 bis 8 h bei 4 °C in IP+150-Puffer, welcher zusätzlich 0,5% BSA enthielt, auf einem Schüttelrad äquilibriert. Die Sepharose wurde vor Zugabe zu dem Gesamtzellextrakt abzentrifugiert (600 x g, 1 min), der Puffer entfernt und die Sepharose in 30 µl IP+150-Puffer resuspendiert. Der Gesamtzellextrakt (0,5-1 mg) wurde mit IP+150-Puffer auf ein Volumen von 200-500 µl eingestellt und mit den entsprechenden Antikörpern (1-5 µg) und 30 µl der äquilibrierten Protein-A- oder Protein-A/G-Sepharose (in Abhängigkeit des Antikörpers) auf einem Schüttelrad für 16 h inkubiert. Hiernach wurden die gebildeten, über Protein-Sepharose immobilisierten, Antikörper-Antigen-Komplexe abzentrifugiert (78 x g, 1 min, 4 °C) und fünfmal mit je 1 ml IP+150-Puffer gewaschen. Die Antikörper-Antigen-Komplexe wurden anschließend in 30 µl 1 x SDS-Puffer für 5 min gekocht und über ein SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurden die separierten Proteine wie in Kap. 3.6.5 beschrieben auf Nitrocellulose-Membranen transferiert und durch Western-Blot detektiert.

3.6.7 Immunfluoreszenz-Untersuchungen

Für Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurden COS7-Zellen wie in Kap. 3.3.1 beschrieben transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die transfizierten Zellen einmal mit PBS⁻ (s. Kap. 2.12) gewaschen und von der Zellkulturoberfläche mittels VT-Lösung (s. Kap. 2.12) gelöst. Die abgelösten Zellen wurden in DMEM-Vollmedium aufgenommen und abzentrifugiert (600 x g, RT, 2 min). Das Zellpellet wurde in DMEM-Vollmedium resuspendiert und auf eine 78 cm²-Zellkulturschale, in der zuvor ein Poly-L-Lysin beschichteter Glasobjektträger gelegt wurde, ausgesät. Nach weiteren 24 h wurde der Glasobjektträger mit den angewachsenen Zellen durch kurzes Eintauchen in PBS (s. Kap. 2.12) gewaschen. Der Glasobjektträger mit den transfizierten Zellen wurde danach sofort in eine 78 cm²-Zellkulturschale, die 15 ml frisch angesetztes Fixativ (3% Paraformaldehyd in PBS) enthielt, überführt und die Zellen für 15 min bei RT fixiert. Nach der Fixierung wurde das Fixativ entfernt und die Zellen zweimal für 5 min in PBS gewaschen. Die Immunfluoreszenz-Untersuchungen der transfizierten und fixierten Zellen wurden in Kooperation mit Phillipe Collas und Kjetil Taskén (Institute of Medical Biochemistry, University of Oslo, Norwegen) durchgeführt. Für die Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurden sowohl die Primärantikörper als auch die FITC- oder

TRITC-konjugierten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:100 (in PBS/0,01% Tween 20, 2% BSA) eingesetzt.

3.6.8 Protein-Protein-Interaktionsstudien mittels des SOS-„Two-Hybrid“-Systems

Das Hefe SOS-„Two-Hybrid“-System (Aronheim *et al.*, 1997) ermöglicht die Analyse von spezifischen Protein-Protein-Interaktionen unter *in vivo*-ähnlichen Bedingungen in Hefezellen. Dieses Hefesystem erlaubt es, im Gegensatz zum Hefe Gal4-„Two-Hybrid“-System (Chevray und Nathans, 1992), Interaktionsanalysen mit transaktivierenden Domänen durchzuführen. Der Selektionsmechanismus des SOS-„Two-Hybrid“-Systems beruht auf einer Interaktion zwischen einem SOS-Fusionsprotein und einem Fusionsprotein, das durch ein Myristylierungssignal (MYR) in die Zellmembran verankert ist. Die interaktionsabhängige Translokation des SOS-Fusionsproteins durch die Interaktion mit dem MYR-Fusionsprotein stellt den SOS-Signaltransduktionsweg des SOS-defizienten *S. cerevisiae*-Mutantenstamms *cdc25-2* wieder her und ermöglicht ein Wachstum bei 36 °C.

3.6.8.1 Herstellung kompetenter *cdc25-2*-Hefen

Die Herstellung kompetenter Hefen des temperatursensitiven *S. cerevisiae*-Stamms *cdc25-2* erfolgte nach Klebe *et al.* (1983). Hierzu wurden 100 µl einer *cdc25-2*-Hefesuspension in 10 ml YPD-Medium angeimpft und bei 25 °C für 18 h geschüttelt (200 rpm). Dann wurde die Kultur 1:25 mit YPD-Medium (s. Kap. 2.12) verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert (25 °C, 200 rpm). Nach Erreichen der OD₆₀₀ (nach 6-8 h) wurden die Hefen bei RT abzentrifugiert (425 x g, 3 min) und das Pellet in 125 ml SBEG-Puffer (s. Kap. 2.12) vorsichtig resuspendiert. Danach wurde nochmals bei RT zentrifugiert (425 x g, 3 min) und das Pellet in 5 ml SBEG-Puffer resuspendiert. Die kompetenten *cdc25-2*-Hefen wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.6.8.2 Transformation kompetenter *cdc25-2*-Hefen

Die Transformation kompetenter *cdc25-2*-Hefen erfolgte nach Lipinski *et al.* (1999). Der Transformationsansatz wurde auf eine YNB^{-Ura/-Leu}-Glucose-Selektionsplatte (s. Kap. 2.12) ausplattiert und für 3-5 Tage bei der nicht-selektiven Wachstumstemperatur von 25 °C im Brutschrank inkubiert.

3.6.8.3 Selektive Wachstumsbedingungen zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen im SOS-„Two-Hybrid“-System

Drei Tage nach Transformation wurden von jedem Transformationsansatz vier Transformanden auf eine neue YNB^{-Ura/-Leu}-Glucose-Selektionsplatte ausgestrichen und für 2-3 Tage bei der nicht-selektiven Wachstumstemperatur von 25 °C im Brutschrank inkubiert.

Ausgehend von dieser Platte erfolgte eine Replika-Plattierung der *cdc25-2*-Hefezellen auf YNB^{-Ura/-Leu}-(-)-Galaktose und YNB^{-Ura/-Leu}-(+)-Galaktose-Selektionsplatten (s. Kap. 2.12). Durch die Galaktose kommt es zu einer Aktivierung des Gal1-Promotors und damit zu Expression des MYR-Fusionsproteins. Eine Interaktion des SOS-Fusionsproteins mit dem MYR-Fusionsprotein führt zu einer Translokation des SOS-Fusionsproteins an die Zellmembran, so daß die SOS-Signalkette wiederhergestellt wird. Interaktionsabhängige Transformanten wurden aufgrund ihres Wachstums nach 3-5 Tagen bei der selektiven Wachstumstemperatur von 36 °C im Brutschrank identifiziert.

3.6.9 Histonacetyltransferase-Analysen (Brownell und Allis, 1995)

Acetyltransferasen katalysieren den Transfer einer Acetylgruppe vom Acetyl-Coenzym A auf die ϵ -Aminogruppen spezifischer Lysine im Substrat. In Histonacetyltransferase-Analysen (HAT-Analysen) kann bestimmt werden, ob die zu untersuchenden Proteine oder Proteinkomplexe HAT-Aktivität besitzen. Die hier beschriebenen HAT-Analysen wurden entweder mit aus Kalbsthymus isolierten Histonen (Sigma Typ IIa, s. Kap. 2.3) oder mit einem synthetisch hergestellten biotinylierten Peptid (s. Kap. 2.3), welches die ersten 24 Aminosäuren des Histons H4 enthält, durchgeführt.

3.6.9.1 HAT-Analysen mit rekombinanten Proteinen

Für HAT-Analysen mit rekombinanten Proteinen wurden 5 μ g bakteriell aufgereinigtes, von der Glutathion-Sepharose eluiertes GST-CBP₁₈₉₀ oder GST-CBP₁₆₉₀ (s. Kap. 3.6.3) mit steigenden Konzentrationen (5 bis 60 μ g) HIS₆-E1A_{12S} (s. Kap. 3.6.2) in 30 μ l HAT-Puffer (s. Kap. 2.12) vermischt. Die HAT-Analysen wurden wie in Kap. 3.6.9.4 beschrieben durchgeführt.

3.6.9.2 Kombinierte GST-Fusionsprotein-Interaktions-/HAT-Analysen

Für kombinierte GST-Fusionsprotein-Interaktions-/HAT-Analysen wurden 10 μ g der entsprechenden, an Glutathion-Sepharose immobilisierten, GST-Fusionsproteine mit 2 mg KB-Gesamtzelleextrakt in IP+150-Puffer (s. Kap. 2.12) für 1 h bei 4 °C auf dem Schüttelrad inkubiert. Hiernach wurden die über Glutathion-Sepharose immobilisierten Fusionsprotein-Protein-Komplexe abzentrifugiert (78 x g, 1 min, 4 °C). Die Komplexe wurden dreimal mit 1 ml IP+150-Puffer und zweimal mit 1 ml HAT-Puffer gewaschen. Die Proteinkomplexe wurden anschließend in 30 μ l HAT-Puffer resuspendiert. Die HAT-Analysen wurden wie in Kap. 3.6.9.4 beschrieben durchgeführt.

3.6.9.3 Kombinierte Immunpräzipitations-/HAT-Analysen

Die Immunpräzipitationen wurden wie in Kap. 3.6.6 beschrieben durchgeführt. Die über Protein-Sepharose immobilisierten Immunkomplexe wurden dreimal mit 1 ml IP+150-Puffer und zweimal mit 1 ml HAT-Puffer gewaschen. Die Immunkomplexe wurden anschließend in 30 µl HAT-Puffer resuspendiert. Die HAT-Analysen wurden wie in Kap. 3.6.9.4 beschrieben durchgeführt.

3.6.9.4 HAT-Analysen

HAT-Analysen wurden in 30 µl HAT-Puffer für 45 min bei 30 °C mit 1 µl [¹⁴C]-Acetyl-CoA und 2 µg des biotinylierten H4-Peptids durchgeführt (Ait-Si-Ali *et al.*, 1998). Danach wurde das Reaktionsvolumen mit HAT-Puffer auf 400 µl erhöht und das radioaktiv markierte Peptid mit 25 µl Streptavidin-Agarose für 1 h bei 4 °C auf dem Schüttelrad immobilisiert. Anschließend wurde zentrifugiert (78 x g, 1 min, 4 °C) und zweimal mit 1 ml HAT-Wasch-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit vermischt und die inkorporierte Radioaktivität gemessen.

3.6.9.5 Qualitative HAT-Analysen

Zur qualitativen Analyse acetylierter Histone wurden 20 µg Kalbsthymus-Histone (H3, H2A, H2B, H4) mit Proteinkomplexen aus GST-Fusionsprotein-Interaktionsexperimenten (s. Kap. 3.6.9.2) in 30 µl HAT-Puffer inkubiert. Nach der Inkubation wurden 20 µl des Reaktionsansatzes mit 6 x SDS-Probenpuffer (Endkonzentration: 1 x SDS-Probenpuffer) vermischt, für 5 min gekocht und auf einem 18%-SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurde das SDS-Polyacrylamidgel wie in Kap. 3.7.2 beschrieben behandelt.

3.7 DNA-Protein-Interaktionsanalysen

3.7.1 Gelretardationsanalysen

Gelretardationsanalysen ermöglichen die Untersuchung der sequenzspezifischen Bindung von Proteinen an doppelsträngige DNA-Sequenzen *in vitro*.

Für die hier durchgeführten Gelretardationsanalysen wurde das E2-CRE-Promotorelement (entspricht der Position nt -105 bis nt -84 im E2_{Ad12}-Promotor und entsprechend im Ad12-Genom der Position von nt 25611 bis nt 25590) als Oligonukleotid synthetisiert. Die radioaktive Endmarkierung des DNA-Fragments erfolgte durch Auffüllen des am 5'-Ende eines Oligonukleotids synthetisierten Guanosintripletts mit dem Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase und [α -³²P]dCTP.

Die Bindungsreaktion zur Bildung von DNA-Protein-Komplexen wurde mit 3 µg Kernextrakt aus KB-Zellen und 1 ng des ³²P-endmarkierten E2-CRE-Oligonukleotids in 20 µl CREB/ATF-Bindungspuffer (s. Kap. 2.12) für 20 min bei RT durchgeführt. Die Bindungsreaktion wurde hiernach auf einem 5%igen nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel bei 200 V gelelektrophoretisch aufgetrennt, wobei als Laufpuffer 0,5 x TBE diente. Nach dem Gellauf wurde das Gel für 20 min in 14%iger Essigsäure fixiert und auf Whatman-Papier überführt. Das Gel wurde anschließend unter Vakuum bei 80 °C getrocknet und bei -80 °C gegen einen Röntgenfilm exponiert.

Für Gelretardationsanalysen mit spezifischen Antikörpern gegen CREB/ATF-Transkriptionsfaktoren wurde der Kernextrakt aus KB-Zellen mit 2 µg des entsprechenden Antikörpers für 16 h bei 4 °C vorinkubiert und anschließend zur Bindungsreaktion gegeben.

Für Kompetitionsanalysen wurde zusätzlich zu dem ³²P-endmarkierten E2-CRE-Oligonukleotid gleichzeitig ein 10-facher oder 100-facher molarer Überschuss eines unmarkierten doppelsträngigen Oligonukleotids zur Bindungsreaktion gegeben. Als Kompetitoren wurden folgende Oligonukleotide benutzt (Oligonukleotidsequenzen s. Kap. 2.18): ein CRE-Som-Oligonukleotid (umspannt den Bereich von nt -60 bis nt -29 im Somatostatin-Promotor der Ratte, Montminy *et al.*, 1986), ein Mut-CRE-Som-Oligonukleotid (CG substituiert durch AT im Bindungsmotiv des CRE-Som) und ein TRE-Oligonukleotid (entspricht der Position des c-jun2-TRE von nt -194 bis nt -178 im humanen c-jun-Promotor; van Dam *et al.*, 1993).

3.7.2 DNA-abhängige Protein-Protein-Interaktionsanalysen

DNA-abhängige Protein-Protein-Interaktionsanalysen ermöglichen die Analyse der Bildung von Multiproteinkomplexen an einem Promotor oder Promotorelement durch die schrittweise Zugabe der einzelnen Proteinkomponenten *in vitro*.

Für die durchgeführten DNA-abhängigen Protein-Protein-Interaktionsanalysen wurde das E2-CRE-Element (entspricht dem Bereich von nt -113 bis nt -80 im E2_{Ad12}-Promotor) als ein 5'-biotinyliertes Oligonukleotid mit einem aus 24 Kohlenstoffatomen bestehenden Abstandshalter zwischen Biotin und Thymin synthetisiert (Metabion, Martinsried). Ein komplementäres Oligonukleotid wurde benutzt, um ein doppelsträngiges Oligonukleotid zu generieren. Das aufgereinigte doppelsträngige Oligonukleotid (1 µg) wurde mit *in vitro* translatiertem ATF-1 oder CREB-1 und 25 µl Neutravidin-Agarose für 1 h bei RT in PC+150-Puffer (s. Kap. 2.12) inkubiert. Danach wurden die über Neutravidin-Agarose gebundenen DNA-Protein-Komplexe abzentrifugiert (78 x g, 1 min, 4 °C) und jeweils dreimal mit 1 ml PC+150-Puffer gewaschen. Darauffolgend wurden die DNA-Protein-Komplexe mit ³⁵S-markiertem, *in vitro* translatiertem E1A_{12S} und/oder CBP für weitere 2 h bei RT in PC+150-Puffer inkubiert und wie oben beschrieben zentrifugiert und gewaschen. Gebundene DNA-Protein-Komplexe wurden anschließend in 30 µl 1 x SDS-Puffer für 5 min gekocht und auf einem 10%-SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Detektion der ³⁵S-markierten Proteine mittels Fluorographie wurde nach dem Gellauf das Gel für 30 min in 100

ml Gelfixierer (s. Kap. 2.12) fixiert. Nach der Fixierung wurde das Gel zweimal für je 5 min mit H₂O gewaschen und für 30 min unter leichtem Schütteln in Amplify inkubiert. Das Gel wurde hiernach auf Whatman-Papier überführt, bei 60 °C auf einem Vakuumtrockner getrocknet und bei -80 °C gegen einen Röntgenfilm exponiert.

3.7.3 Chromatin-Immunpräzipitationen

Die Analyse von DNA-Protein-Interaktionen *in vivo* wird durch die Chromatin-Immunpräzipitation ermöglicht. Chromatin-Immunpräzipitationen (CHIP) wurden nach Protokollen von Dedon *et al.* (1991), Braunstein *et al.* (1993) und Luo *et al.* (1998) durchgeführt. Hierfür wurden 2 x 10⁶ KB-Zellen mit Reportergenkonstrukten wie in Kap. 3.3.1 beschrieben transfiziert. Um Histone mit DNA quervernetzen, wurde 40 h nach Transfektion Formaldehyd in einer Endkonzentration von 1% zum Zellkulturmedium gegeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS (s. Kap. 2.12) gewaschen, mittels eines Gummischabers von der Zellkulturschale gelöst und bei 600 x g, 4 °C abzentrifugiert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten bei 4 °C.

Das Zellpellet wurde in 200 µl CHIP-Lyse-Puffer (s. Kap. 2.12) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Um die DNA in eine immunpräzipitierbare Größe zwischen 200-1000 bp zu überführen, wurde das Lysat fünfmal für 10 s pulsierend auf Eis beschallt (Stufe 3). Dann wurde das Lysat für 10 min bei 18000 x g zentrifugiert. Ein Drittel des Überstandes wurde benutzt, um die Konzentration des betreffenden Reporterkonstrukts in den transfizierten Zellen zu quantifizieren (im Folgenden als Total bezeichnet). Die restlichen Zweidrittel des Überstandes wurden fünffach mit CHIP-Lyse-Puffer verdünnt und mit 5 µl eines anti-acetyl H4-Antikörpers oder einem Kontrollantikörper auf einem Schüttelrad für 16 h inkubiert. Die Immunkomplexe wurden dann für 2 h mit 60 µl Protein A-Sepharose, die ebenfalls für 16 h in CHIP-Lyse-Puffer und 10 µg gescherter Heringssperma-DNA äquilibriert wurde, inkubiert. Hiernach wurden die gebildeten, über Protein A-Sepharose immobilisierten Immunkomplexe abzentrifugiert (78 x g, 1 min, 4 °C). Die anschließenden Wasch- und Elutionsschritte der Immunkomplexe erfolgten exakt nach Braunstein *et al.* (1993). Die DNA-Protein-Quervernetzung wurde für 5 h bei 65 °C revertiert, gefolgt von einem Proteinase K-Verdau für 1 h bei 50 °C. Die DNA wurde nachfolgend durch Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt, über Nacht bei -20 °C präzipitiert (wobei 20 µg Glycogen als inerte Fällungshilfe zugesetzt wurde) und in H₂O aufgenommen. Die Detektion der Reportergenkonstrukte erfolgte über PCR (Denaturierung: 94 °C, 1 min; Anlagerung: 55 °C, 1 min; Synthese: 72 °C, 1 min; 20 Zyklen), wobei 1 µl einer Probe in die PCR eingesetzt wurde. Die PCR-Produkte wurden über konventionelle Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

4. Ergebnisse

Die adenovirale E2-Region kodiert für Proteine, die für die virale DNA-Replikation im produktiven Entwicklungszyklus von Adenoviren essentiell sind. Die Expression dieser Proteine von der E2-Region wird im Verlauf der adenoviralen Infektion durch den sog. E2-Promotor reguliert. Eine Aktivierung des Ad2/5 E2-Promotors durch die N-terminale Transaktivierungsdomäne der Ad12 E1A-Proteine wurde durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt (Lipinski *et al.*, 1997). Der Ad2/5 E2-Promotor stellt jedoch für die Ad12 E1A-Proteine einen physiologisch nicht-relevanten Promotor dar. Aus diesem Grund war es für das Verständnis der Ad12 E1A-vermittelten Regulationsmechanismen im lytischen Entwicklungszyklus entscheidend, die Transkriptionsaktivierung durch die N-terminale Domäne auf dem für die Ad12 E1A-Proteine physiologisch relevanten Ad12 E2-Promotor (im Folgenden als E2_{Ad12}-Promotor bezeichnet) zu analysieren. Die Aufklärung dieser Aktivierungsmechanismen durch das Ad12 E1A_{12S}-Protein ist Bestandteil meiner Arbeit.

4.1 Der E2_{Ad12}-Promotor enthält ein cAMP-Response-Element

Zu Beginn meiner Untersuchungen war die Nukleotidsequenz der putativen E2_{Ad12}-Promotorregion des Ad12-Genoms zwar beschrieben (Sprengel *et al.*, 1994), funktionelle Analysen bezüglich seiner Regulation lagen jedoch nicht vor. Um putative Transkriptionsfaktorbindestellen zu identifizieren, wurde die nach Sprengel *et al.* (1994) beschriebene E2_{Ad12}-Promotorregion (nt 25921-25501 im Ad12-Genom) mit Hilfe des Softwareprogramms TFSearch Version 3.1 (Heinemeyer *et al.*, 1998; s. u. <http://www.genome.ad.jp/SIT/TFSEARCH.html>) hinsichtlich *cis*-regulatorischer Promotorelemente analysiert. Durch diese Computeranalyse wurden in einem 140 bp-umfassenden Promotorbereich Konsensussequenzen für ein cAMP-Response-Element (im Folgenden als E2-CRE bezeichnet, nt -99 bis -92; relativ zum +1 definierten Transkriptionsstart; Abb. 5) und für ein E2F-Element (im Folgenden als E2-E2F bezeichnet, nt -89 bis -82; Abb. 5) identifiziert. Weiterhin konnte eine TATA-Box (nt -29 bis -24) im E2_{Ad12}-Promotor identifiziert werden. Diese Transkriptionsfaktorbindestellen sind zwischen den Ad12 und Ad2/Ad5 E2-Promotoren konserviert (Abb. 5). Dem E2_{Ad12}-Promotor fehlt im Vergleich zum Ad2/5 E2-Promotor die proximale E2F-Konsensussequenz und die TATA-Box (TBP₋₂₆) des minimalen Ad2/5 E2-Promotors (Abb. 5). Im Falle von Ad2/Ad5 sind alle *cis*-regulatorischen Promotorelemente für eine E1A-vermittelte Transaktivierung essentiell (Swaminathan und Thimmapaya, 1995). Entscheidend für die Aktivierung des Ad2/5 E2-Promotors ist weiterhin die kooperative Bindung zweier E2F-Transkriptionsfaktorkomplexe, deren Interaktion durch das orf (open reading frame) 6/7-Protein der E4-Region von Ad2/5 stabilisiert wird (Swaminathan und Thimmapaya, 1995 und Referenzen hierin).



Abb. 5: Schematischer Vergleich der Nukleotidsequenzen der E2-Promotorregionen von Ad12 und Ad2/5. Die Nukleotidsequenz des E2_{Ad12}-Promotors ist von nt -106 bis -16 angegeben. Die Sequenzen der in dieser Arbeit identifizierten Promotorelemente E2-CRE, E2-E2F und TATA des E2_{Ad12}-Promotors sind markiert. Der Ad2/5 E2-Promotor ist nach Swaminathan und Thimmapaya (1995) von nt -80 bis +8 angegeben. Die unterstrichenen Sequenzen im Ad2/5 E2-Promotor markieren die Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren ATF, E2F und TBP. E2F_(D) bezeichnet die distale E2F- und E2F_(P) bezeichnet die proximale E2F-Bindestelle im Ad2/5 E2-Promotor. TBP₍₋₂₆₎ bezeichnet die TATA-Box des minimalen Ad2/5 E2-Promotors (nach Swaminathan und Thimmapaya, 1995).

Da dem E2_{Ad12}-Promotor im Vergleich zum Ad2/5 E2-Promotor die proximale E2F-Konsensussequenz sowie eine zweite TATA-Box fehlt und bis zum heutigen Zeitpunkt kein Protein mit vergleichbarer Funktion zum orf 6/7-Protein der E4-Region von Ad2/5 bei Ad12 beschrieben ist, deutet dies an, daß der Aktivierungsmechanismus des E2_{Ad12}-Promotors und des Ad2/5 E2-Promotors durch die Ad12 E1A-Proteine unterschiedlich verläuft.

Für alle nachfolgenden Fragestellungen bezüglich des Aktivierungsmechanismus des E2_{Ad12}-Promotors wurde das E1A_{12S}-Protein benutzt, um somit unabhängig von den regulatorischen Funktionen der CR3-Domäne zu sein. Wie in der Einleitung dargestellt (s. Kap. 1.3), werden viele der transaktivierenden Funktionen des E1A_{13S}-Proteins durch die Interaktion der CR3-Domäne mit generellen Transkriptionsfaktoren und Mediatoren vermittelt. Da dies generell zu einer starken Transaktivierung von Zielpromotoren führt, wäre hierdurch eine funktionelle Analyse der N-terminalen Transaktivierungsdomäne der Ad12 E1A-Proteine nicht möglich (s. Kap. 1.3).

Um zu untersuchen, welche Funktion die identifizierten Promotorelemente im E2_{Ad12}-Promotor in der basalen wie auch der E1A_{12S}-vermittelten Regulation ausüben und ob zusätzliche, durch die computergestützte Analyse nicht identifizierte putative Promotorelemente die Aktivität des E2_{Ad12}-Promotors regulieren, wurden transiente Expressionsstudien in KB-Zellen durchgeführt. Hierzu wurden Punktmutationen und ausgehend vom 5'-Ende des E2_{Ad12}-Gesamtpromotorbereichs fortschreitende Deletionen des E2_{Ad12}-Promotors generiert, in den basalen Reporter-Gen-Vektor pBL-CAT3 kloniert und die Reporter-Genaktivität der entsprechenden E2_{Ad12}-CAT-Reporterkonstrukte nach Kotransfektion mit einem eukaryontischen E1A_{12S}-Expressionsvektor in KB-Zellen bestimmt (Abb. 6). Das Reporter-Genkonstrukt E2_{Ad12}(420bp)-CAT, welches den E2_{Ad12}-Gesamtpromotorbereich enthält, zeigte in Abwesenheit des E1A_{12S}-Proteins in KB-Zellen eine geringe Basalaktivität (Abb. 6). Die Kotransfektion eines Expressionsplasmids für das E1A_{12S}-Protein führte zu einer 5,3-fachen Aktivierung der CAT-Genexpression (Abb. 6). Die

Induktion der CAT-Genexpression ist hierbei ausschließlich auf die E2_{Ad12}-Promotorsequenzen zurückzuführen, da das Grundreportergenkonstrukt pBL-CAT3 weder eine basale noch eine E1A_{12S}-vermittelte Expression des CAT-Gens bewirkt (Abb. 6). Erstaunlicherweise hatten die Promotordeletionen bis zur Position nt -140 im E2_{Ad12}-Promotor [E2_{Ad12}(389bp)-CAT, E2_{Ad12}(324bp)-CAT, E2_{Ad12}(215bp)-CAT und E2_{Ad12}(140bp)-CAT] keinen Einfluß auf die basale und die E1A_{12S}-vermittelte CAT-Genexpression (Abb. 6).

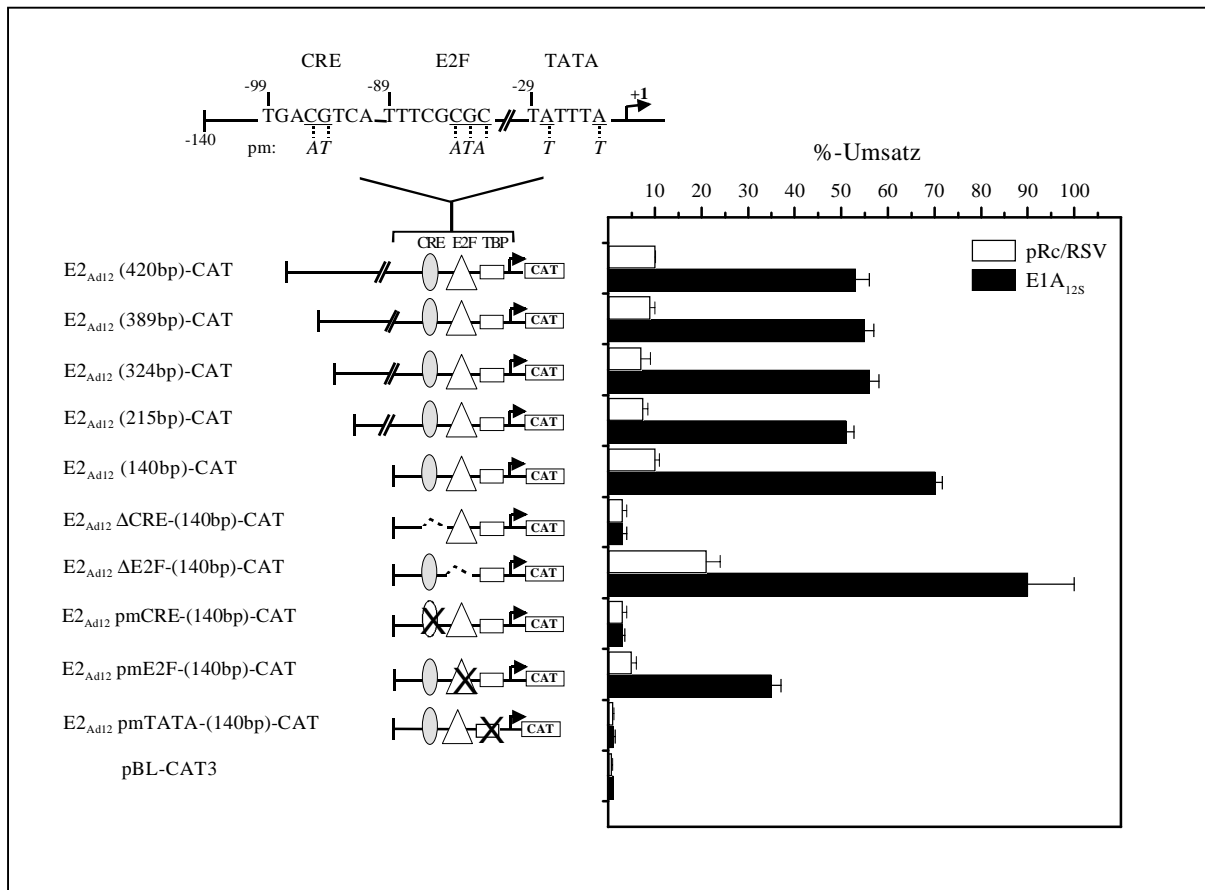


Abb. 6: Das E1A_{12S}-Protein aktiviert den E2_{Ad12}-Promotor über ein CRE. KB-Zellen wurden mit 1 µg des entsprechenden Reporterkonstrukts [E2_{Ad12}(420bp)-CAT, E2_{Ad12}(389bp)-CAT, E2_{Ad12}(324bp)-CAT, E2_{Ad12}(215bp)-CAT, E2_{Ad12}(140bp)-CAT, E2_{Ad12}ΔCRE-(140bp)-CAT, E2_{Ad12}ΔE2F-(140bp)-CAT, E2_{Ad12}pmCRE-(140bp)-CAT, E2_{Ad12}pmE2F-(140bp)-CAT, E2_{Ad12}pmTATA-(140bp)-CAT oder pBL-CAT3] und 0,5 µg pRc/RSV (weiße Balken) oder 0,5 µg pRc/RSV-E1A_{12S}-Expressionsvektor (schwarze Balken) kotransfiziert. Die CAT-Enzymaktivität wurde 24 h nach Transfektionsende bestimmt. Die Aktivierungswerte entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Transfektionsexperimenten. %-Umsatz entspricht den Prozenten des umgesetzten [¹⁴C]-Chloramphenicols zu seinen acetylierten Formen. Der nach Sprengel *et al.* (1994) definierte E2_{Ad12}-Promotorbereich ist schematisch über der Abbildung dargestellt. Die Positionen und Sequenzen der in dieser Arbeit identifizierten Promotorelemente relativ zum Transkriptionsstartpunkt (+1) sind angegeben. Pm bezeichnet die eingeführten Punktmutationen in der Konsensussequenz des identifizierten Promotorelements im Kontext des Wildtyp-Reporterkonstrukts.

Jedoch führte eine Deletion der E2-CRE-Sequenz [E2_{Ad12}ΔCRE-(140bp)-CAT] oder Punktmutationen in diesem Element [E2_{Ad12}pmCRE-(140bp)-CAT] zu transkriptionell inaktiven Promotorkonstrukten (Abb. 6). Im Gegensatz hierzu bewirkte eine Deletion der E2-E2F-Sequenz [E2_{Ad12}ΔE2F-(140bp)-CAT] eine erhöhte Basalaktivität des Reporterkonstrukts. Dies läßt die Vermutung zu, daß die E2-E2F-Sequenz repressorisch wirksam ist. In Übereinstimmung mit dieser Annahme zeigen Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen, daß

E2F-Sequenzen in Abhängigkeit des Promotorkontexts und des untersuchten Zelltyps repressorisch wirksam sind und die Expression des Zielgens inhibieren (He *et al.*, 2000 und Referenzen hierin). Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß es durch die Deletion der E2F-Sequenz zu einer räumlichen Veränderung des Promotors gekommen ist, die möglicherweise zu einer erleichterten Interaktion der promotorgebundenen Transkriptionsfaktoren mit der basalen Transkriptionsmaschinerie führt. Die Punktmutationen in der E2-E2F-Sequenz [E2_{Ad12}pmE2F-(140bp)-CAT] hatten im Vergleich zu der vollständigen Deletion dieser Sequenz eine deutlich verringerte Basalaktivität des Reporterkonstrukts zur Folge (Abb. 6). Die Gründe hierfür sind nicht klar, könnten aber wahrscheinlich darauf zurückzuführen sein, daß die eingeführten Punktmutationen strukturelle Veränderungen im Promotor bewirkt haben. Wichtigerweise zeigten beide Promotorkonstrukte ein vergleichbares relatives Aktivungsverhältnis bezüglich der E1A_{12S}-aktivierten CAT-Genexpression wie das Reporterkonstrukt E2_{Ad12}(140bp)-CAT (Abb. 6). Dies deutet darauf hin, daß für die E1A_{12S}-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors in KB-Zellen das E2-CRE notwendig ist.

Erwartungsgemäß führten Punktmutationen in der TATA-Box zu einem vollständigen Verlust der basalen wie auch der E1A_{12S}-induzierten Expression des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-pmTATA-140bp-CAT, welches im Einklang mit der Funktion der TATA-Box als entscheidendes Positionierungselement für den Präinitiationskomplex steht (Abb. 6; Orphanides *et al.*, 1996).

Zusammenfassend kann aus den transienten Expressionsanalysen geschlossen werden, daß (1) der Promotorbereich von nt -420 bis -140 für die Transkriptionsaktivierung durch das E1A_{12S}-Protein in KB-Zellen nicht notwendig ist und (2) die E2-CRE-Sequenz (nt -99 bis -92) und die TATA-Box (nt -39 bis -24) entscheidende Promotorelemente für die Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors darstellen. Dagegen scheint die E2-E2F-Sequenz von den identifizierten Promotorelementen am wenigsten zur Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors in KB-Zellen beizutragen.

4.2 Das E1A_{12S}-Protein aktiviert den E2_{Ad12}-Promotor in Abhängigkeit des N-Terminus und der CR1-Domäne

In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, daß das E1A_{12S}-Protein neben der CR1-Domäne eine zweite, unabhängige Transaktivierungsdomäne im N-Terminus (As 1-29) enthält (Lipinski *et al.*, 1997). Um zu untersuchen, ob beide Transaktivierungsdomänen an der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein beteiligt sind, wurden transiente Expressionsanalysen durchgeführt. Hierzu wurde das Reporterkonstrukt E2_{Ad12}(140bp)-CAT (im weiteren Verlauf als E2_{Ad12}-CAT bezeichnet) mit Expressionsvektoren für ein E1A_{12S}-Wildtyp-Protein und davon abgeleiteten Proteinmutanten, bei denen entweder der N-Terminus (As 1-29; Δ N/E1A_{12S}), die CR1-Domäne (As 39-79; Δ CR1/E1A_{12S}) oder der N-Terminus und die CR1-Domäne (As 1-79, Δ 1-79/E1A_{12S}) deletiert wurden, in KB-Zellen

kotransfiziert. Wie in Abb. 7B dargestellt, war keine der eingesetzten E1A_{12S}-Proteinmutanten in der Lage, die Transkription des Reportergens zu aktivieren.

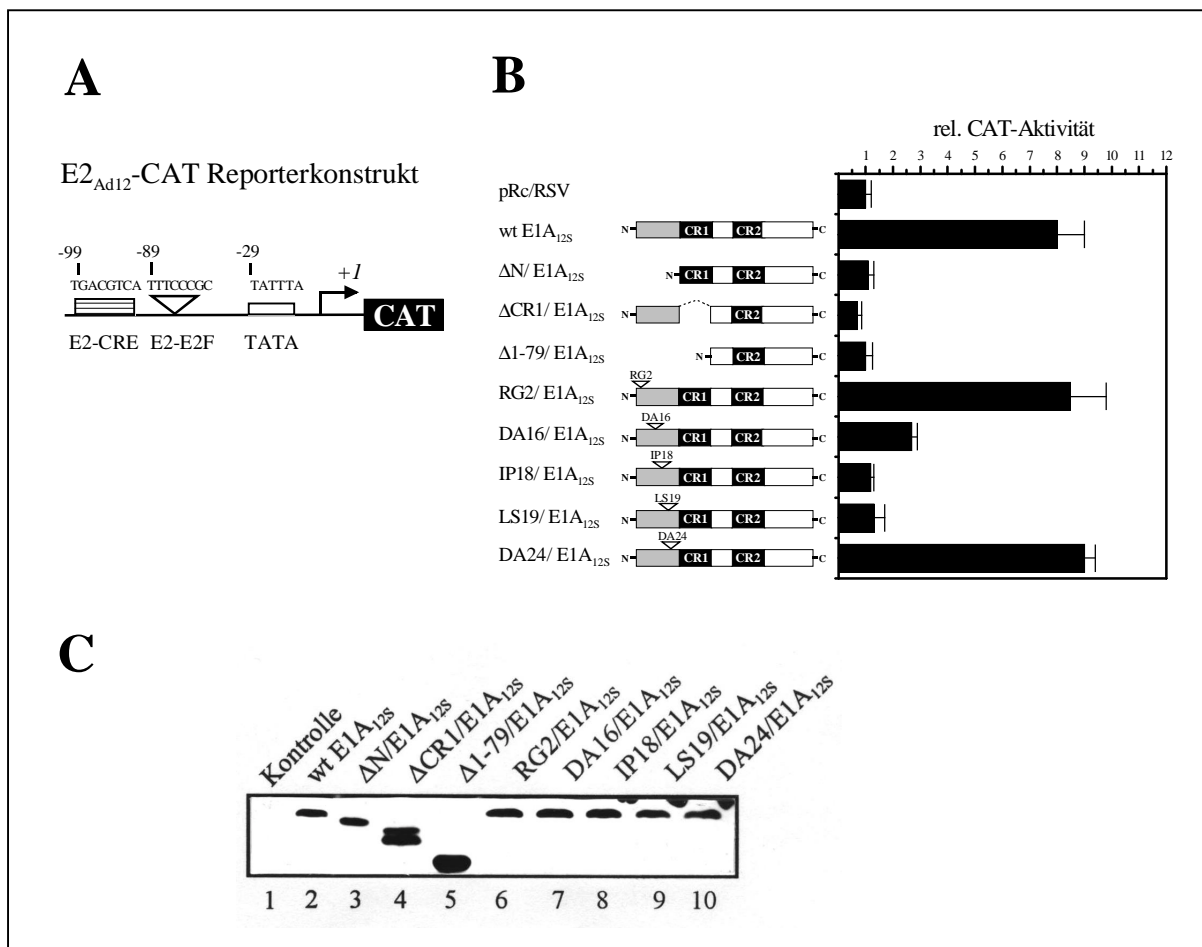


Abb. 7. Das E1A_{12S}-Protein aktiviert den E2_{Ad12}-Promotor in Abhängigkeit des N-Terminus und der CR1-Domäne. **A.** Schematische Darstellung des eingesetzten Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT. Die CAT-Genexpression im Reporterkonstrukt E2_{Ad12}-CAT wird durch ein 140bp-Fragment des E2_{Ad12}-Promotors reguliert (nt 25641-25501 im Ad12-Genom). Das E2-CRE-Element, die E2-E2F-Erkennungssequenz und die TATA-Box sind dargestellt. **B.** KB-Zellen wurden mit 1 µg des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT und 0,5 µg pRc/RSV-Leervektor oder verschiedenen pRc/RSV-E1A_{12S}-Expressionsvektoren wie angegeben kotransfiziert. Die CAT-Enzymaktivität wurde 24 h nach Transfektionsende bestimmt. Die relativen Aktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Transfektionsexperimenten. Die Promotoraktivität des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT in Anwesenheit des Leervektors pRc/RSV wurde als 1 normiert. **C.** Kontrolle der Expression der E1A_{12S}-Proteinmutanten in transfizierten Zellen. Gesamtzellextrakte aus COS7-Zellen wurden mittels Western-Blot mit einem anti-Ad12 E1A-Antiserum analysiert.

Da die Deletion des N-Terminus und der CR1-Domäne zu einem Verlust der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors führte und beide Domänen für eine Interaktion mit den zellulären Koaktivatoren p300/CBP notwendig sind (als Übersicht s. Moran, 1994), wurde untersucht, ob zwischen der Transaktivierung des E2_{Ad12}-Promotors und einer Interaktion mit diesen Koaktivatoren ein Zusammenhang besteht. In früheren Arbeiten wurde im Falle der Ad2 E1A-Proteine gezeigt (Wang *et al.*, 1993), daß die Aminosäure Arginin an Position 2 und die Aminosäuren Leucin und Asparaginsäure an den Positionen 20 und 21 für die Interaktion mit den Koaktivatoren p300/CBP essentiell sind. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden vergleichbare Aminosäuren im N-Terminus des Ad12 E1A_{12S}-Proteins mutiert. Durch die Kotransfektion von Expressionsvektoren für E1A_{12S}-Proteinmutanten, die

in der N-terminalen Transaktivierungsdomäne Punktmutationen enthielten (Abb. 7B), wurden drei Aminosäuren im N-Terminus identifiziert, deren Mutation zu einem stark reduzierten (DA16/E1A_{12S}; Abb. 7B) oder vollständigen Verlust (IP18/E1A_{12S} und LS19/E1A_{12S}; Abb. 7B) der Transaktivierungsfunktion des E1A_{12S}-Proteins führten. Im Gegensatz dazu hatte die Punktmutation des Arginins an Position 2 (RG2/E1A_{12S}) oder der Asparaginsäure an Position 24 (DA24/E1A_{12S}) im E1A_{12S}-Protein keinen Einfluß auf das Transaktivierungspotential. Beide E1A_{12S}-Proteinmutanten induzierten die Expression des Reporterkonstrukts wie das E1A_{12S}-Wildtyp-Protein (Abb. 7B).

Daß ein Unterschied oder ein Verlust des transaktivierenden Potentials der E1A_{12S}-Proteinmutanten nicht auf eine unterschiedliche Konzentration dieser Proteine in den transfizierten Zellen zurückzuführen war, wurde durch Western-Blot-Analysen bestätigt (Abb. 7C).

Diese Daten beweisen, daß sowohl die N-terminale Transaktivierungsdomäne (unter Beteiligung der Aminosäuren Asparaginsäure an Position 16, Isoleucin und Leucin an den Positionen 18 und 19) als auch die CR1-Domäne für die Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein von entscheidender Bedeutung sind. Die hier durchgeführten Mutationsanalysen des E1A_{12S}-Proteins deuten zudem an, daß die Transaktivierungsfunktion des E1A_{12S}-Proteins von einer direkten Interaktion mit den zellulären Koaktivatoren p300/CBP abhängt (Abb. 13).

4.3 Die zellulären Transkriptionsfaktoren CREB-1 und ATF-1 binden an das E2-CRE des E2_{Ad12}-Promotors

In den transienten Promotormutationsanalysen (Abb. 6) wurde gezeigt, daß das E2-CRE-Promotorelement eines der entscheidenden *cis*-regulatorischen Sequenzen für die Regulation des E2_{Ad12}-Promotors darstellt. Zur Klärung des Aktivierungsmechanismus des viralen Promotors durch das E1A_{12S}-Protein war es daher wichtig zu analysieren, welche zellulären Transkriptionsfaktoren an diese Sequenz innerhalb des E2_{Ad12}-Promotors binden. Nachfolgend sollte dann untersucht werden, ob die identifizierten Transkriptionsfaktoren an der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein beteiligt sind. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden zuerst Gelretardationsanalysen (s. Kap. 3.7.1) durchgeführt. Die Inkubation eines Kernextrakts aus KB-Zellen mit einem radioaktiv markierten E2-CRE-Oligonukleotid führte zur Bildung von drei retardierten DNA-Protein-Komplexen, wobei sich die Komplexe 2 und 3 als die dominanten Protein-DNA-Komplexe darstellten (Abb. 8B und Abb. 8C, Spur 2; Abb. 8C ist eine Überexposition der Abb. 8B, um Komplex 1 deutlich darzustellen). Um die Spezifität dieser Protein-DNA-Komplexe zu prüfen, wurden Kompetitionsanalysen mit einem 10- oder 100-fach molaren Überschuß an unmarkierten Kompetitionsoligonukleotiden (Abb. 8A) durchgeführt. Die Protein-DNA-Komplexe 1-3 konnten effizient durch einen 10- und 100-fach molaren Überschuß eines unmarkierten E2-CRE (Abb. 8B/8C, Spur 3 und 4) oder durch einen 10- und 100-fach molaren Überschuß eines unmarkierten Oligonukleotids, welches das Somatostatin-CRE (CRE-Som) enthält und

die klassische CREB/ATF-Konsensussequenz repräsentiert (Abb. 8B/8C, Spur 5 und 6; Montminy *et al.*, 1986), kompetiert werden. Die Bildung des Komplexes 1 wurde durch die Inkubation mit einem 10- oder 100-fach molaren Überschuß eines unmarkierten Oligonukleotids, welches das c-jun2-TRE des humanen c-jun-Promotors umspannt und von c-Jun/ATF-2-Transkriptionsfaktorkomplexen gebunden wird (van Dam *et al.*, 1993), verhindert.

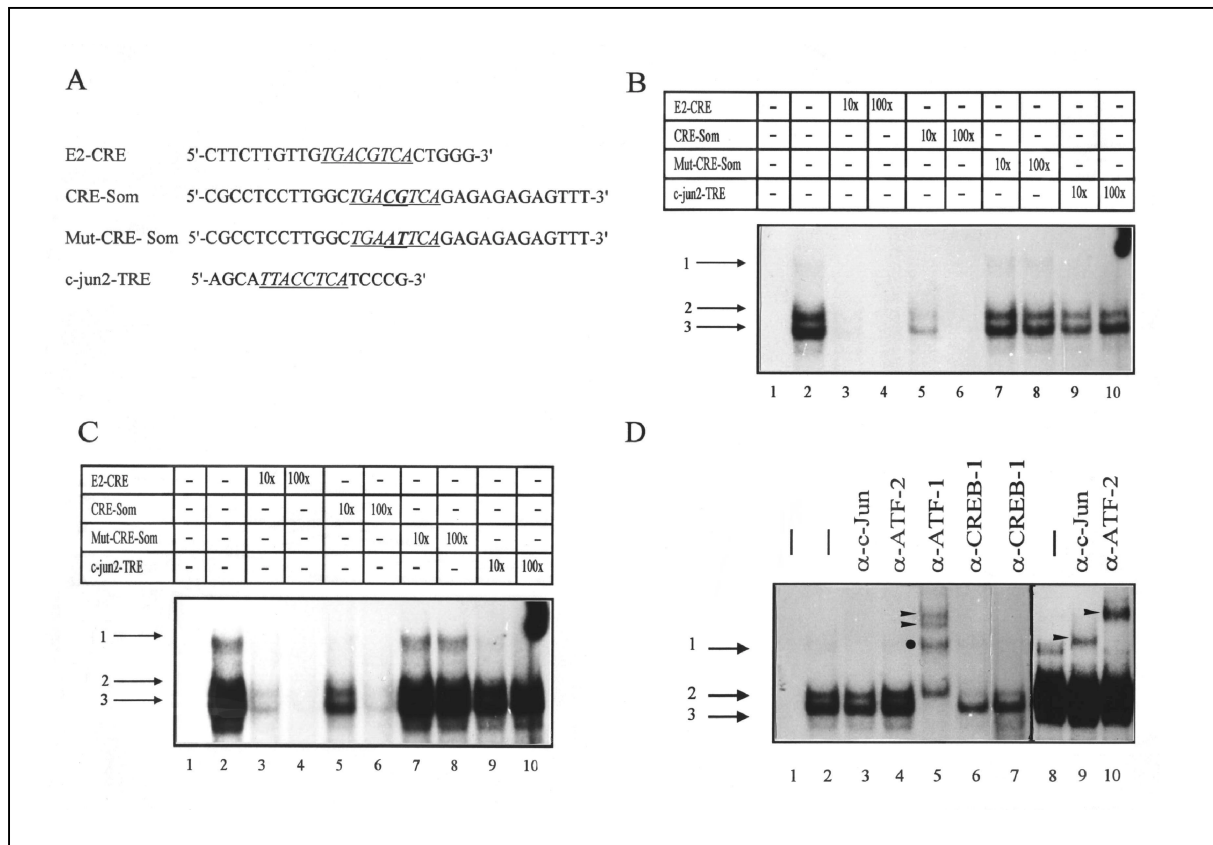


Abb. 8. Die zellulären Transkriptionsfaktoren CREB-1 und ATF-1 binden an das E2-CRE. **A.** In den Gelretardationsanalysen eingesetzte Oligonukleotide: CRE-Som enthält das CRE-Element des Ratten-Somatostatin-Promotors und wird hauptsächlich von CREB-1 und/oder ATF-1 gebunden. Mut-CRE-Som enthält zwei Punktmutationen (*CG* substituiert durch *AT*) im Kernmotiv des CRE-Elements des Somatostatin-Promotors, die zu einem Verlust der Bindung von Faktoren aus der CREB- und ATF-Familie führen (Montminy *et al.*, 1986); c-jun2-TRE umspannt das c-jun2-TRE des humanen c-jun-Promotors und wird ausschließlich von c-Jun/ATF-2-Heterodimeren gebunden (van Dam *et al.*, 1993). **B.** In Kompetitionsanalysen wurde das ³²P-endmarkierte E2-CRE-Oligonukleotid (nt -105 bis -84 im E2_{Ad12}-Promotor) mit Kernextrakt aus KB-Zellen in Anwesenheit eines 10-fach oder 100-fach molaren Überschusses an unmarkierten Kompetitoren inkubiert wie es über der Abbildung dargestellt ist (Spuren 3 bis 10). Spur 2 zeigt die retardierten DNA-Protein-Komplexe in Abwesenheit eines Kompetitors, Spur 1 zeigt das ³²P-endmarkierte E2-CRE-Oligonukleotid ohne Kernextrakt. Die Positionen der Komplexe sind links durch Pfeile markiert. Die DNA-Protein-Komplexe wurden auf einem 5%igen nativen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. **C.** zeigt eine Überexposition desselben Gels aus (**B**) um den Komplex 1 deutlich zu zeigen. **D.** Für Gelretardationsanalysen mit spezifischen Antikörpern gegen ATF, Jun und CREB wurde das ³²P-endmarkierte E2-CRE-Oligonukleotid (nt -105 bis -84 im E2_{Ad12}-Promotor) mit Kernextrakt aus KB-Zellen in Abwesenheit (Spur 2) oder Anwesenheit von Antikörpern (Spuren 3 bis 7; Spuren 8-10 sind eine Überexposition der Spuren 1-3 um die zusätzlich retardierten Komplexe aus Komplex 1 darzustellen) inkubiert und auf einem 5%igen nativen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Spur 1 zeigt das ³²P-endmarkierte E2-CRE-Oligonukleotid ohne Kernextrakt. Komplexe mit verändertem Laufverhalten sind durch Pfeile oder einen schwarzen Punkt markiert.

Die Bildung der Komplexe 2 und 3 wurde hingegen nur sehr schwach durch diesen Kompetitor beeinflusst (Abb. 8C, Spuren 9 und 10). Dagegen führte die Anwesenheit eines unmarkierten mutierten Somatostatin-CRE-Oligonukleotids (Mut-CRE-Som), in dem eine CG

zu AT-Punktmutation in der Konsensussequenz eingeführt wurde (Abb. 8A), zu keiner signifikanten Beeinflussung der retardierten DNA-Protein-Komplexe (Abb. 8B/8C, Spur 7 und 8). Diese Punktmutationen im Somatostatin-CRE führen zu einem Verlust der Bindung von Transkriptionsfaktoren aus der CREB- oder ATF-Familie an dieses Promotorelement *in vitro* und zu einem Verlust der cAMP-vermittelten Transaktivierung des Somatostatin-Promotors *in vivo* (Montminy *et al.*, 1986). Die Kompetitionsanalysen weisen darauf hin, daß drei spezifische Transkriptionsfaktorkomplexe an das E2-CRE *in vitro* binden können. Die Komplexe 2 und 3 enthalten möglicherweise Transkriptionsfaktoren aus der CREB- oder ATF-Transkriptionsfaktorfamilie, da sie effizient durch das CRE-Promotorelement des Somatostatin-Promotors kompetiert wurden. Der Komplex 1 enthält wahrscheinlich Faktoren aus der Jun- und ATF-Transkriptionsfaktorfamilie, da dieser Komplex durch das c-jun2-TRE des c-jun-Promotors kompetiert wurde.

Als nächstes wurde durch Gelretardationsanalysen mit spezifischen Antikörpern gegen Mitglieder aus der ATF-, Jun- und CREB-Familie geklärt, welche Transkriptionsfaktoren an der Bildung der Komplexe 1-3 beteiligt sind. Die Inkubation eines anti-ATF-1-Antikörpers verhinderte die Bildung des Komplexes 3 (Abb. 8D, Spur 5). Weiterhin interferierte dieser Antikörper mit der Bildung des Komplexes 2 (Abb. 8D, Spur 5). Darüber hinaus führte die Inkubation mit dem spezifischen anti-ATF-1-Antikörper zu einer Bildung zweier weiterer retardierter DNA-Protein-Antikörper-Komplexe (Abb. 8D, Spur 5, Komplexe sind durch einen Pfeil markiert). Ein dritter Komplex komigriert mit Komplex 1 (Abb. 8D, Spur 5, markiert durch einen schwarzen Punkt), wobei hier nicht zwischen der Bildung eines zusätzlich retardierten DNA-Protein-Antikörper-Komplexes oder einer Stabilisierung des Komplexes 1 durch den anti-ATF-1-Antikörper differenziert werden konnte. Die Inkubation mit einem polyklonalen anti-CREB-1-Antiserum, das gegen die DNA-Bindedomäne von CREB-1 und ATF-1 gerichtet und somit kreuzreaktiv mit ATF-1 ist, verhinderte die Bildung des Komplexes 2 und reduzierte deutlich den Komplex 3 (Abb. 8D, Spur 6). Ein vergleichbares Ergebnis, wenn auch vom Effekt her nicht so deutlich wie mit dem polyklonalen anti-CREB-1-Antiserum, wurde durch die Inkubation mit einem monoklonalen anti-CREB-1-Antikörper (gegen die DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne von CREB-1 gerichtet) erzielt (Abb. 8D, Spur 7). Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die Komplexe 2 und 3 die cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktoren CREB-1 und ATF-1 beinhalten.

Durch die Inkubation mit einem anti-c-Jun-Antikörper (Abb. 8D, Spuren 3 und 9; Spur 9 ist eine Überexposition der Spur 3) sowie einem anti-ATF-2-Antikörper (Abb. 8D, Spuren 4 und 10; Spur 10 ist eine Überexposition der Spur 4) wurden in Komplex 1 die Transkriptionsfaktoren c-Jun- und ATF-2 nachgewiesen.

Da in den transienten Expressionsstudien gezeigt wurde, daß die E2-E2F-Erkennungssequenz eine untergeordnete Funktion bei der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein ausübt (Abb. 6), wurde kontrolliert, ob dieses identifizierte Promotorelement von E2F/DP-Transkriptionsfaktorkomplexen *in vitro* gebunden werden kann. Durchgeführte

Gelretardationsanalysen mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid, welches das E2-E2F-Element umspannt (nt -91 bis nt -80 im E2_{Ad12}-Promotor), und Kernextrakt aus KB-Zellen in Anwesenheit verschiedener Antikörper gegen E2F-Transkriptionsfaktoren sowie gegen das DP-1 Protein, dem Dimerisierungspartner von E2F-Faktoren (als Übersicht s. Cobrinik, 1996 und Referenzen hierin) zeigten, daß das E2-E2F-Motiv zumindest von einem E2F-4/DP-1-Heterodimer gebunden wird (Daten nicht gezeigt). Warum diesem Komplex keine oder nur eine untergeordnete Funktion im Aktivierungsprozeß des E2_{Ad12}-Promotors zukommt, ist gegenwärtig noch unklar.

4.4 Die zellulären Transkriptionsfaktoren CREB-1 und ATF-1 aktivieren den E2_{Ad12}-Promotor

Durch die Ergebnisse der Gelretardationsanalysen wurde der Nachweis erbracht, daß das E2-CRE-Promotorelement von CREB-1/ATF-1- oder c-Jun/ATF-2-beinhaltenen Transkriptionsfaktorkomplexen *in vitro* gebunden wird. Um zu untersuchen, welche der identifizierten Transkriptionsfaktorkomplexe die E1A_{12S}-aktivierte Transkription des E2_{Ad12}-Promotors *in vivo* vermitteln, wurden transiente Expressionsanalysen durchgeführt. Hierzu wurde der DNA-bindedefekte, dominant-negativ wirkende Inhibitor A-CREB eingesetzt (Ahn *et al.*, 1998). A-CREB ist ein Fusionsprotein bestehend aus einem sauren, amphipatischen Polypeptid, das elektrostatisch DNA mimikriert, und der Leucin-Zipper-Domäne von CREB. Nach der Bildung von Heterodimeren zwischen A-CREB und endogenem CREB-1 oder ATF-1 verhindert A-CREB die Interaktion dieser Transkriptionsfaktoren mit ihrer Zielsequenz. Da CREB-1 und ATF-1 weder mit ATF-2 noch mit c-Jun Heterodimere bilden (Hai und Curran, 1991; Hoeffler *et al.*, 1991), inhibiert A-CREB ausschließlich das transaktivierende Potential der cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktoren CREB-1 und ATF-1.

Die Kotransfektion von A-CREB mit dem Reporterkonstrukt E2_{Ad12}-CAT in KB-Zellen führte zu einem deutlichen Verlust der basalen CAT-Genexpression (Abb. 9). Entscheidend in diesen transienten Expressionsanalysen war, daß A-CREB auch die E1A_{12S}-induzierte Aktivierung des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT inhibierte (Abb. 9).

Um auszuschließen, daß A-CREB nicht mit der c-Jun/ATF-2-vermittelten Transaktivierung interferiert, wurde der Expressionsvektor für A-CREB mit dem Reporterkonstrukt phc-jun(-1600/+740)-CAT (umspannt nt -1600 bis + 740 des humanen c-jun-Promotors, van Dam *et al.*, 1990; van Dam *et al.*, 1993) kotransfiziert. Das E1A_{12S}-Protein aktiviert den humanen c-jun-Promotor über c-Jun/ATF-2-beinhaltenen Proteinkomplexe (van Dam *et al.*, 1990; van Dam *et al.*, 1993). Im Gegensatz zum Reporterkonstrukt E2_{Ad12}-CAT wurde weder die basale noch die E1A_{12S}-aktivierte CAT-Genexpression des humanen c-jun-Promotors in Anwesenheit von A-CREB inhibiert (Abb. 9).

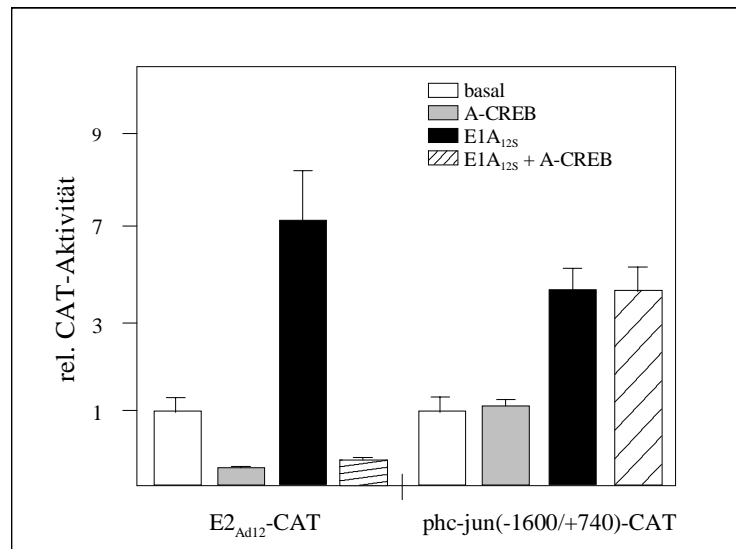


Abb. 9. Die cAMP/PKA-abhängigen Transkriptionsfaktoren CREB-1 und ATF-1 aktivieren den E2_{Ad12}-Promotor. KB-Zellen wurden mit 1 µg des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT oder phc-jun(-1600/+740)-CAT, 0,2 µg pRc/CMV- und 0,5 µg pRc/RSV-Leervektor (weiße Balken), 0,2 µg des CREB-Inhibitors pRc/CMV-A-CREB (punktierte Balken), 0,5 µg pRc/RSV-E1A_{12S} (schwarze Balken) oder mit 0,2 µg pRc/CMV-A-CREB und 0,5 µg pRc/RSV-E1A_{12S} (schraffierte Balken) kotransfiziert. Die Menge an transfizierter DNA wurde durch Auffüllen der entsprechenden Leervektoren konstant gehalten. Die CAT-Enzymaktivität wurde 24 h nach Transfektionseende bestimmt. Die relativen Aktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Transfektionsexperimenten. Die Promotoraktivität sowohl des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT als auch des Reporterkonstrukts phc-jun(-1600/+740)-CAT in Anwesenheit der Leervektoren pRc/CMV und pRc/RSV wurde als 1 normiert.

Wenn die Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1 für die Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein wichtig sind, dann sollte der spezifische Aktivator dieser zellulären Transkriptionsfaktoren, die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), zu einer Aktivierung des viralen Promotors führen. Die PKA-vermittelte Serinphosphorylierung von CREB-1/ATF-1 ermöglicht die Rekrutierung der zellulären Koaktivatoren p300/CBP, die für die Aktivierung cAMP/PKA-abhängiger Promotoren entscheidend sind (als Übersicht s. Montminy, 1997). Die Transfektion eines eukaryontischen Expressionsvektors für die katalytische Untereinheit C α der PKA ergab eine 4,2-fache Aktivierung des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT, die vergleichbar mit der Aktivierung durch das E1A_{12S}-Protein in diesem Experiment war (4-fach; Abb. 10). Dagegen führte die Expression des E1A_{12S}-Proteins in Anwesenheit der katalytischen Untereinheit C α unter diesen Bedingungen nur zu einer geringfügig erhöhten Aktivierung des Reporterkonstrukts (5,3-fach; Abb. 10).

Zur weiteren Bestätigung, daß der E2_{Ad12}-Promotor durch die cAMP/PKA-abhängigen Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1 aktiviert wird, wurde der PKA-spezifische Inhibitor PKI in transienten Expressionsanalysen eingesetzt. PKI besitzt eine Pseudosubstratbindestelle für die katalytische C-Untereinheit und ein nukleäres Exportsignal, wodurch die PKI-gebundene C-Untereinheit aus dem Zellkern transportiert wird (Day *et al.*, 1989; Wen *et al.*, 1995). Dadurch wird die C α -vermittelte Phosphorylierung von CREB-1/ATF-1 verhindert und es kommt zu einer Repression cAMP/PKA-abhängiger Zielgene.

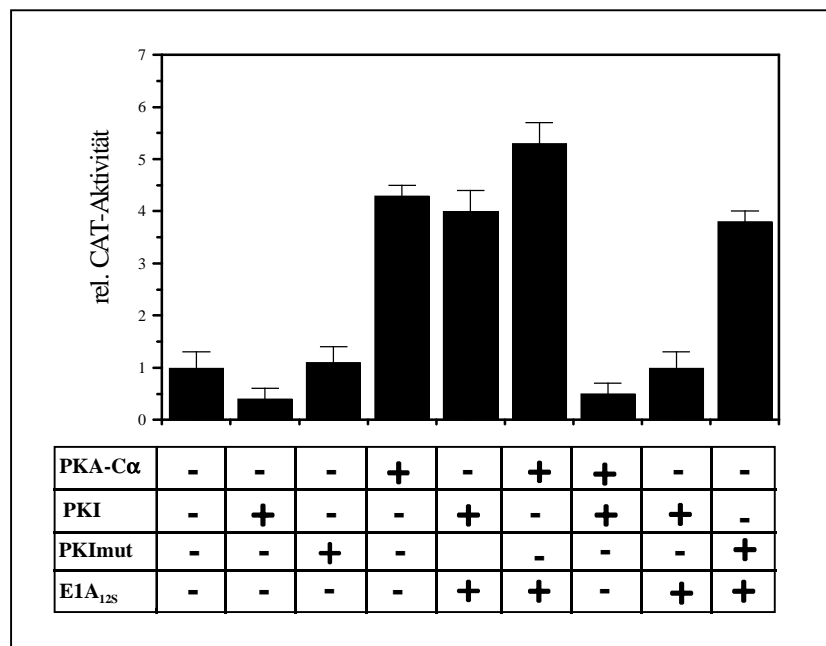


Abb. 10. Die katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA-C α) transaktiviert den E2_{Ad12}-Promotor. KB-Zellen wurden mit 1 μ g des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT und 0,5 μ g RSV-CHO-PKA-C α -, 1 μ g pRc/RSV-PKI-, 1 μ g pRc/RSV-PKImut- oder 0,5 μ g E1A_{12S}-Expressionsvektor wie angegeben kotransfiziert. Die Menge an transfizierter DNA wurde durch Auffüllen des Leervektors pRc/RSV konstant gehalten. Die CAT-Enzymaktivität wurde 24 h nach Transfektionseende bestimmt. Die relativen Aktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Transfektionsexperimenten. Die Promotoraktivität des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT in Anwesenheit des Leervektors pRc/RSV wurde als 1 normiert.

Erwartungsgemäß führte die Koexpression des PKA-spezifischen Inhibitors PKI zu einem Verlust der Aktivierung des E2_{Ad12}-CAT-Reporterkonstrukts durch die C α -Untereinheit der PKA (Abb. 10). Interessanterweise inhibierte PKI auch die E1A_{12S}-vermittelte Aktivierung des Reportergens (Abb. 10). Dagegen hatte die Koexpression der PKI-Mutante PKImut, die nicht mehr an die C α -Untereinheit bindet und diese somit nicht aus dem Zellkern transportiert (Day *et al.*, 1989), keinen Einfluß auf die Aktivierung des Reporterkonstrukts durch das E1A_{12S}-Protein.

Diese Ergebnisse stützen die Annahme, daß das E1A_{12S}-Protein den E2_{Ad12}-Promotor über die cAMP/PKA-abhängigen Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1 und nicht über c-Jun/ATF-2-beihaltende Transkriptionsfaktorkomplexe aktiviert. Weiterhin deuten die Daten darauf hin, daß sowohl die Proteinkinase A als auch das E1A_{12S}-Protein möglicherweise überschneidende Mechanismen zur Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors benutzen (s. ab Kap. 4.13).

4.5 Die zellulären Transkriptionsfaktoren CREB-1 und ATF-1 interagieren mit dem E1A_{12S}-Protein *in vitro* und *in vivo*

Da adenovirale E1A-Proteine keine DNA-Bindungseigenschaften besitzen, vermitteln sie ihre transkriptionelle Aktivität durch Protein-Protein-Interaktionen mit zellulären Komponenten wie DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren (s. Kap. 1.3). Eine Möglichkeit, wie das E1A_{12S}-Protein den E2_{Ad12}-Promotor aktivieren könnte, besteht daher in

einer direkten Interaktion mit den zellulären Transkriptionsfaktoren CREB-1 und ATF-1. Durch die Bindung an diese DNA-bindenden Faktoren würde es den Transaktivierungsdomänen innerhalb des E1A_{12S}-Proteins ermöglicht, mit Koaktivatoren oder Faktoren des RNA-PolIII-Holoenzym im Aktivierungsprozeß des viralen Promotors in Kontakt zu treten.

Um erste Hinweise eines möglichen Aktivierungsmechanismus zu erlangen, wurde zunächst untersucht, ob die zellulären Transkriptionsfaktoren CREB-1 und ATF-1 mit dem E1A_{12S}-Protein *in vitro* interagieren. Hierzu wurden GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen (s. Kap. 3.6.4) mit verschiedenen GST-E1A_{12S}-Fusionsproteinen und ³⁵S-markiertem, *in vitro* transkribiertem/translatiertem CREB-1 oder ATF-1 durchgeführt.

Wie aus den Abbildungen 11A und 11B ersichtlich, binden CREB-1 und ATF-1 an das E1A_{12S}-Protein (Spur 3). Die Deletion der Aminosäuren 1-79 des E1A_{12S}-Proteins führte zu einem Verlust der Interaktion mit CREB-1 und ATF-1 (GST-Δ1-79/E1A_{12S}; Abb. 11A und 11B, Spur 6). Die Deletion der N-terminalen Domäne (GST-ΔN/E1A_{12S}; Abb. 11A und 11B, Spur 4) oder der CR1-Domäne (GST-ΔCR1/E1A_{12S}; Abb. 11A und 11B, Spur 5) bewirkte eine deutliche Reduktion des Bindungspotentials des E1A_{12S}-Proteins an diese Transkriptionsfaktoren.

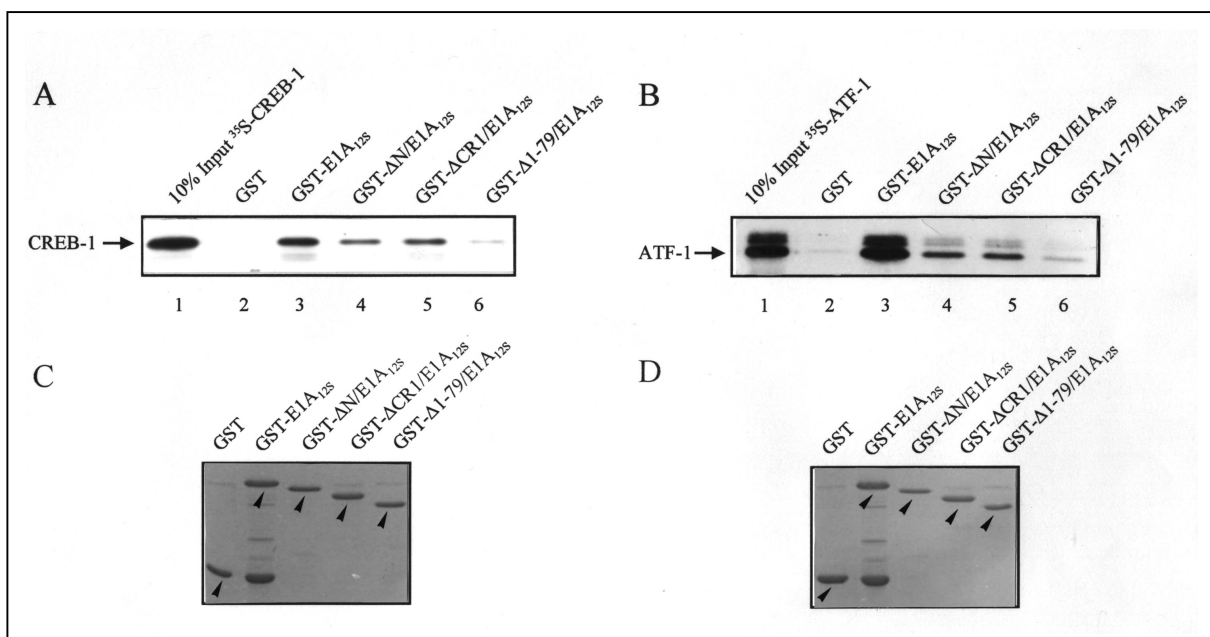


Abb. 11. CREB-1 und ATF-1 binden an das E1A_{12S}-Protein *in vitro*. Für die GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen wurde *in vitro* translatiertes, ³⁵S-markiertes CREB-1 (A) oder *in vitro* translatiertes, ³⁵S-markiertes ATF-1 (B) mit der GST-Proteindomäne (Spur 2) oder verschiedenen GST-E1A_{12S}-Fusionsproteinen wie angegeben (Spuren 3 bis 6) inkubiert. Interagierende Proteine wurden eluiert, auf 10%-SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und durch Fluorographie detektiert. Spur 1 repräsentiert 10% des Inputs von ³⁵S-CREB-1 (A) oder ³⁵S-ATF-1 (B). C und D. Kontrolle der Mengen der unter (A) und (B) eingesetzten GST-Fusionsproteine in den GST-Fusionsprotein-Interaktionsexperimenten. Gleiche Aliquots der GST-Fusionsproteine wurden auf 10%-SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung detektiert.

Die GST-Proteindomäne zeigte keine nachweisbare Affinität zu CREB-1 oder ATF-1 (Abb. 11A und 11B, Spur 2). Kontrollexperimente belegten zudem, daß vergleichbare

Mengen an GST-Fusionsproteinen in den *in vitro*-Protein-Protein-Interaktionsanalysen eingesetzt wurden (vgl. Abb. 11A mit 11C und Abb. 11B mit 11D). Diese Daten beweisen, daß das E1A_{12S}-Protein mit CREB-1 und ATF-1 *in vitro* interagiert und daß für eine effiziente Interaktion die N-terminale Domäne und die CR1-Domäne des adenoviralen Proteins entscheidend sind.

Um genauere Hinweise über den Aktivierungsmechanismus des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein unter Beteiligung der cAMP/PKA-abhängigen Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1 zu erlangen, war es wichtig zu bestätigen, ob das E1A_{12S}-Protein mit CREB-1 und ATF-1 auch *in vivo* interagiert. Zu diesem Zweck wurden COS7-Zellen mit Expressionsvektoren für das E1A_{12S}-Protein oder davon abgeleiteten Deletionsmutanten transfiziert. Die Immunpräzipitationen wurden mit einem anti-CREB-Antiserum (als Ab240 bezeichnet; Yamamoto *et al.*, 1990) oder einem anti-ATF-1-Antikörper durchgeführt (s. Kap. 3.6.6) und die Immunkomplexe im Western-Blot mit einem anti-Ad12 E1A-Antiserum analysiert.

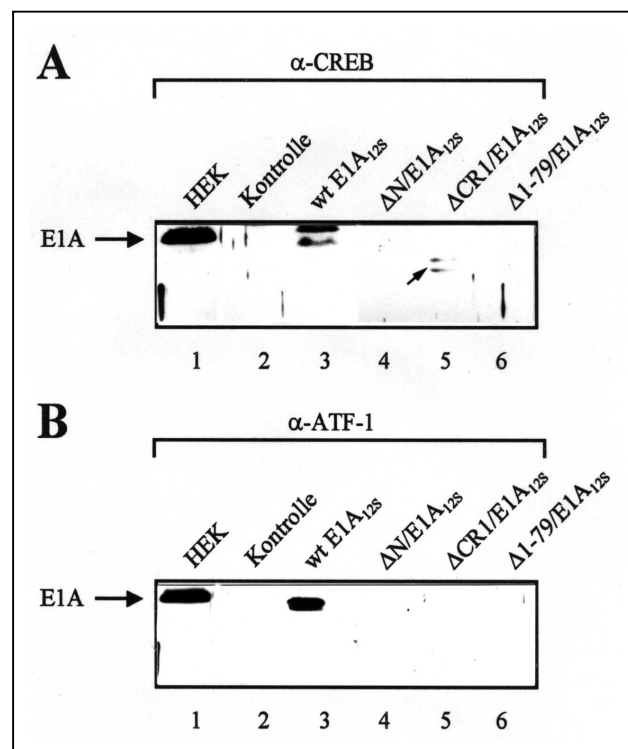


Abb. 12. CREB-1 und ATF-1 interagieren mit dem E1A_{12S}-Protein *in vivo*. COS7-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für das E1A_{12S}-Wildtyp-Protein oder davon abgeleiteten Proteindeletionsmutanten wie angegeben transfiziert. Die Zellen wurden 72 h später lysiert und der Gesamtzellextrakt mit einem anti-CREB-Antiserum (**A**, Ab240; Yamamoto *et al.*, 1990) oder einem anti-ATF-1-Antikörper (**B**) inkubiert. Gebildete Immunkomplexe wurden auf einem 13%-SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot mit einem anti-Ad12 E1A-Antiserum analysiert. Als Western-Blot-Kontrolle wurde in der Spur 1 Gesamtzellextrakt aus einer Ad12 E1-transformierten Zelllinie (HEK, Whittaker *et al.*, 1984) aufgetragen.

In der Immunpräzipitation mit dem anti-CREB-Antiserum konnten zwei E1A_{12S}-spezifische Proteinbanden detektiert werden (Abb. 12A, Spur 3), die wahrscheinlich unterschiedliche Phosphorylierungszustände des E1A_{12S}-Proteins repräsentieren (Lucher *et al.*, 1985; Richter *et al.*, 1988). Kein E1A_{12S}-spezifisches Signal wurde in den

Immunkomplexen aus Kontroll-transfizierten Zellen nachgewiesen (Abb. 12A, Spur 2). Die E1A_{12S}-Proteinmutante Δ CR1/E1A_{12S} zeigte eine geringe Affinität zu CREB-1 *in vivo* (Abb. 12A, Spur 5; markiert durch einen Pfeil), während die Deletion des N-Terminus (Δ N/E1A_{12S}, Abb. 12A, Spur 4) oder die Deletion der Aminosäuren 1-79 (Δ 1-79/E1A_{12S}, Abb. 12A, Spur 6) des E1A_{12S}-Proteins einen Verlust der Interaktion mit CREB-1 *in vivo* bewirkte.

Die Immunpräzipitation mit einem anti-ATF-1-Antikörper führte zu einer Kopräzipitation des E1A_{12S}-Proteins (Abb. 12B, Spur 3). Dagegen war kein E1A_{12S}-spezifisches Proteinsignal mit den E1A_{12S}-Proteinmutanten Δ N/E1A_{12S} (Fig. 12B, Spur 4), Δ CR1/E1A_{12S} (Abb. 12B, Spur 5) sowie Δ 1-79/E1A_{12S} (Abb. 12B, Spur 6) nachweisbar. Western-Blot-Analysen der für die Immunpräzipitationen eingesetzten Gesamtzellextrakte bestätigten, daß das E1A_{12S}-Protein und davon abgeleiteten Deletionsmutanten in vergleichbarer Konzentration in den transfizierten COS7-Zellen vorhanden waren (Daten nicht gezeigt und Abb. 7C).

Zusammenfassend weisen die Daten darauf hin, daß das E1A_{12S}-Protein mit CREB-1 und ATF-1 *in vivo* interagiert. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß diese Interaktion indirekt ist und durch ein drittes Protein wie z. B. den zellulären Koaktivatoren p300/CBP, die ebenfalls an CREB-1 und ATF-1 binden, vermittelt wird.

4.6 Die E1A_{12S}-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors korreliert mit der Fähigkeit des adenoviralen Proteins an die zellulären Koaktivatoren p300/CBP zu binden

Die Rekrutierung der zellulären Koaktivatoren p300/CBP durch CREB-1 oder ATF-1 an Zielpromotoren ist für das transaktivierende Potential dieser Transkriptionsfaktoren von entscheidender Bedeutung (als Übersicht s. Montminy, 1997). Das Ad12 E1A_{12S}-Protein interagiert kooperativ über den N-Terminus und die CR1-Domäne mit p300/CBP (Lipinski *et al.*, 1999) und beide Proteindomänen sind zudem essentiell für die E1A_{12S}-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors (Abb. 7B). Diese Daten deuten darauf hin, daß eine Interaktion zwischen p300/CBP (die beiden Koaktivatoren p300 und CBP werden aufgrund ihrer nicht unterscheidbaren Funktionen bezüglich der CRE-vermittelten Transkription als äquivalent betrachtet, wenn dies nicht gesondert spezifiziert ist; s. Kap. 1.4) und dem adenoviralen Protein im Zuge der Transkriptionsaktivierung des E2_{Ad12}-Promotors von Bedeutung sein könnte. Folglich wurde untersucht, ob die E1A_{12S}-aktivierte Transkription des E2_{Ad12}-Promotors mit einer Interaktion des adenoviralen Proteins und CBP *in vivo* korreliert.

Hierzu wurden COS7-Zellen mit Expressionsvektoren für das E1A_{12S}-Protein oder davon abgeleiteten Proteinmutanten transfiziert und Immunpräzipitationen mit einem anti-CBP-Antiserum durchgeführt (s. Kap. 3.6.6). Die Immunkomplexe wurden durch Western-Blot mit einem anti-Ad12 E1A-Antiserum analysiert. Erwartungsgemäß interagierte das E1A_{12S}-Wildtyp-Protein mit CBP (Abb. 13, Spur 3), wohingegen die Deletion der N-terminalen Domäne des E1A_{12S}-Proteins (Δ N 1-29) die Bindung an CBP verhinderte (Δ N/E1A_{12S}; Abb. 13, Spur 4) und die Deletion der CR1-Domäne des E1A_{12S}-Proteins die

Bindung an CBP deutlich verminderte (Δ CR1/E1A_{12S}; Abb. 13, Spur 5). Eine E1A_{12S}-Proteinmutante, bei der sowohl der N-Terminus als auch die CR1-Domäne deletiert wurde, war nicht mehr in der Lage an CBP zu binden (Δ 1-79/E1A_{12S}; Abb. 13, Spur 6).

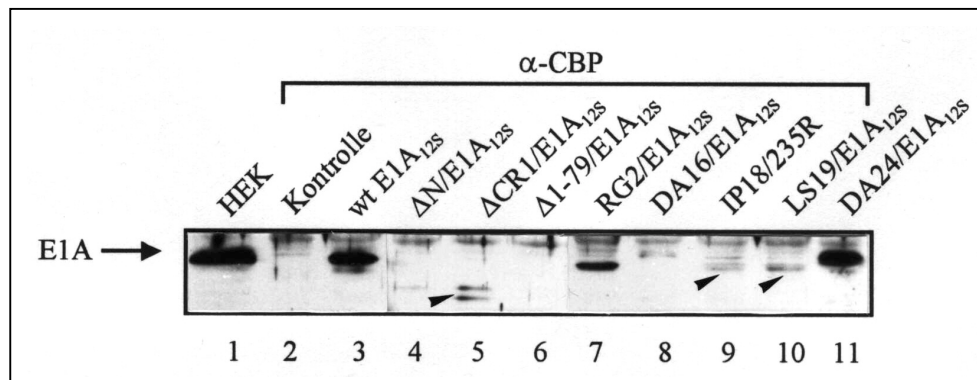


Abb. 13. Das E1A_{12S}-Protein bindet an den zellulären Koaktivator CBP in Abhängigkeit des N-Terminus und der CR1-Domäne. COS7-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für das E1A_{12S}-Wildtyp-Protein oder davon abgeleiteten Proteinmutanten transfiziert. Die Zellen wurden 72 h später lysiert und der Gesamtzellextrakt mit einem anti-CBP-Antiserum (A-22) inkubiert. Immunkomplexe wurden auf einem 13%-SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot mit einem anti-Ad12 E1A-Antiserum analysiert. Spur 1 zeigt als Positivkontrolle einen Western-Blot eines Gesamtzellextrakts einer Ad12 E1-transformierten Zelllinie (HEK; Whittaker *et al.*, 1984), Spur 2 zeigt Kontroll-transfizierte COS7-Zellen.

Interessanterweise war die E1A_{12S}-Proteinmutante, bei der die Asparaginsäure an Position 16 gegen Alanin ausgetauscht wurde (DA16/E1A_{12S}), nicht mehr in der Lage mit CBP *in vivo* zu interagieren (Abb. 13, Spur 8). Weiterhin zeigten die E1A_{12S}-Proteinmutanten IP18/E1A_{12S} und LS19/E1A_{12S}, bei denen Isoleucin an Position 18 gegen Prolin und Leucin an Position 19 gegen Serin ausgetauscht wurde, nahezu keine Affinität mehr zu CBP (Abb. 13, Spur 9 und 10). Hingegen interagierten die Proteinmutanten, bei denen Arginin an Position 2 gegen Glycin bzw. Asparaginsäure an Position 24 gegen ein Alanin ausgetauscht wurde (RG2/E1A_{12S} bzw. DA24/E1A_{12S}), mit CBP vergleichbar wie das E1A_{12S}-Wildtyp-Protein (Abb. 13, Spuren 7 und 11). Western-Blot-Analysen der für die Immunpräzipitationen eingesetzten Gesamtzellextrakte bestätigten, daß das E1A_{12S}-Protein und davon abgeleiteten Proteinmutanten in vergleichbaren Konzentrationen in den transfizierten COS7-Zellen vorhanden waren (Daten nicht gezeigt und Abb. 7C), so daß ein Verlust der Interaktion zwischen CBP und dem E1A_{12S}-Protein *in vivo* nicht auf Unterschiede in der Proteinkonzentration der E1A_{12S}-Proteine in den Zellen zurückzuführen ist. Die Interaktion zwischen dem E1A_{12S}-Protein und CBP wurde durch GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen mit Gesamtzellextrakten aus HeLa-Zellen und den entsprechenden GST-E1A_{12S}-Fusionsproteinen bestätigt (Lipinski *et al.*, 1999). Identische Ergebnisse sind auch für p300 *in vitro* und *in vivo* ermittelt worden (Lipinski *et al.*, 1999 und Daten nicht gezeigt).

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, daß das adenovirale Protein durch die zellulären Faktoren CREB-1 oder ATF-1 kopräzipitiert wurde, wurde untersucht, ob eine Interaktion zwischen dem E1A_{12S}-Protein und CBP direkt verläuft oder über CREB-1 oder ATF-1, die ebenfalls mit p300/CBP *in vivo* interagieren, indirekt vermittelt wird.

Hierzu wurden GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen mit rekombinanten GST-CBP- und HIS₆-E1A_{12S}-Fusionsproteinen durchgeführt. Gebundenes E1A_{12S}-Protein wurde durch Western-Blot-Analysen mit einem anti-Ad12 E1A-Antiserum detektiert. Diese Experimente zeigten, daß das E1A_{12S}-Protein direkt mit CBP interagiert (Abb. 14, Spur 3). Da die GST-Proteindomäne keine Affinität zum adenoviralen Fusionsprotein hat (Abb. 14, Spur 2), konnte aus den Ergebnissen geschlossen werden, daß das E1A_{12S}-Protein direkt an CBP bindet.

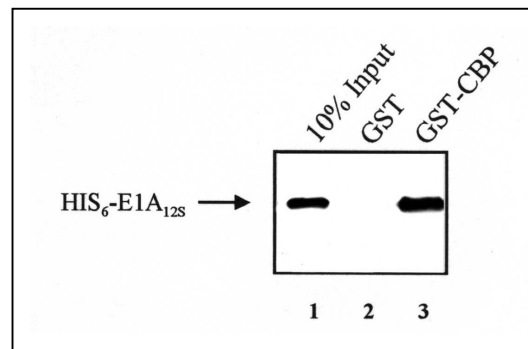


Abb. 14: Das E1A_{12S}-Proteins interagiert direkt mit dem zellulären Koaktivator CBP. Für GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen wurde bakteriell exprimiertes und aufgereinigtes HIS₆-E1A_{12S}-Fusionsprotein mit der GST-Proteindomäne (Spur 2) oder dem GST-CBP-Wildtyp-Protein (Spur 3, die Expression des Vollängen-CBP-Fusionsproteins wurde durch Western-Blot mit einem gegen den C-Terminus gerichteten CBP-Antikörper verifiziert; Daten nicht gezeigt) inkubiert. Interagierende Proteine wurden eluiert, auf einem 10%-SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot mit dem anti-Ad12 E1A-Antiserum analysiert. Spur 1 repräsentiert 10% des Inputs des eingesetzten HIS₆-E1A_{12S}-Fusionsproteins.

Vergleichende Untersuchungen der Immunpräzipitationen mit den transienten Expressionsanalysen der E1A_{12S}-Proteinmutanten deuten an, daß eine Interaktion des E1A_{12S}-Proteins zu dem zellulären Koaktivator CBP mit der Fähigkeit des adenoviralen Proteins korreliert, den E2_{Ad12}-Promotor zu transaktivieren (vgl. Abb. 7B und Abb. 13; als Zusammenfassung s. Abb. 22). Die E1A_{12S}-Proteinmutanten $\Delta N/E1A_{12S}$, $\Delta CR1/E1A_{12S}$, $\Delta 1-79/E1A_{12S}$, DA16/E1A_{12S}, IP18/E1A_{12S} und LS19/E1A_{12S} haben entweder keine oder nur eine geringe Affinität zu CBP. Diese Proteinmutanten besitzen kein oder nur ein schwaches Potential (DA16/E1A_{12S}), den E2_{Ad12}-Promotor zu transaktivieren. Im Gegensatz dazu interagieren die Proteinmutanten RG2/E1A_{12S} und DA24/E1A_{12S} mit CBP und aktivieren den E2_{Ad12}-Promotor wie das E1A_{12S}-Wildtyp-Protein. Diese Daten verdeutlichen, daß eine Interaktion zwischen dem E1A_{12S}-Protein und CBP (und p300) im Prozeß der Transkriptionsaktivierung des E2_{Ad12}-Promotors notwendig ist.

4.7 Die Transkriptionsfaktoren CREB-1 und ATF-1 rekrutieren das E1A_{12S}-Protein an das E2-CRE

Die Daten aus den Protein-Protein-Interaktionsanalysen zeigen, daß die DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren CREB-1 und ATF-1 mit dem E1A_{12S}-Protein interagieren (Abb. 11 und 12). Eine Möglichkeit für das E1A_{12S}-Protein im Aktivierungsprozeß des viralen E2_{Ad12}-Promotors wäre, daß das adenovirale Protein durch die promotorgebundenen Transkriptionsfaktoren CREB-1 und/oder ATF-1 an den E2_{Ad12}-Promotor rekrutiert wird. Dadurch könnten die Transaktivierungsdomänen innerhalb des E1A_{12S}-Proteins mit anderen Faktoren wie z. B. Koaktivatoren oder generellen Transkriptionsfaktoren in Kontakt treten.

Zur Untersuchung eines möglichen Rekrutierungsmechanismus des adenoviralen Proteins durch die CRE-bindenden Transkriptionsfaktoren CREB-1 und/oder ATF-1 wurden DNA-abhängige Protein-Protein-Interaktionsanalysen durchgeführt. Ein 5'-biotinyliertes E2-CRE-Oligonukleotid (s. Kap. 3.7.2) wurde mit *in vitro* translatiertem, unmarkiertem CREB-1 oder ATF-1 und *in vitro* translatiertem, ³⁵S-markiertem E1A_{12S}-Protein inkubiert. Gebildete DNA-Protein-Komplexe wurden über Avidin-Agarose isoliert und die gebundenen Proteine nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mittels Fluorographie detektiert. Diese Experimente bewiesen, daß CREB-1 und ATF-1 mit dem E1A_{12S}-Protein einen Komplex auf dem E2-CRE bilden (Abb. 15A, Spuren 6 und 7). In Abwesenheit der zellulären Transkriptionsfaktoren zeigt das E1A_{12S}-Protein eine sehr schwache Affinität zu dem E2-CRE (Abb. 15A, Spur 5), was in Übereinstimmung mit den publizierten Daten steht, daß E1A-Proteine keine intrinsische DNA-Bindungseigenschaften besitzen (Ferguson *et al.*, 1985). Kontrollexperimente belegten weiterhin, daß die DNA-abhängigen Protein-Protein-Interaktionsanalysen strikt von dem immobilisierten E2-CRE-Oligonukleotid abhängig sind, da in dessen Abwesenheit weder CREB-1 noch ATF-1 nachgewiesen wurden (Abb. 15A, vgl. die Spuren 3 und 4 mit den Spuren 1 und 2).

Da CREB-1 und ATF-1 mit dem E1A_{12S}-Protein auf dem E2-CRE einen Proteinkomplex bilden und sowohl CREB-1/ATF-1 als auch das E1A_{12S}-Protein mit CBP *in vivo* interagieren, wurde nachfolgend untersucht, ob die Inkubation mit dem zellulären Koaktivatorprotein CBP zur Bildung eines quaternären DNA-Protein-Komplexes führt. Die Inkubation von *in vitro* translatiertem, ³⁵S-markiertem CBP verhinderte nicht die CREB-vermittelte Rekrutierung des E1A_{12S}-Proteins an das E2-CRE (Abb. 15B, Spur 6), obwohl der N-Terminus und die CR1-Domäne sowohl an der Interaktion mit dem Koaktivator CBP (Abb. 13, Spuren 4-6) als auch mit CREB-1 involviert sind (Abb. 11A und 12A). Der Koaktivator CBP besitzt keine DNA-Bindeaktivität (Abb. 15B, Spur 2), sondern wird durch CREB-1 an das E2-CRE rekrutiert (Abb. 15B, Spur 4). Erstaunlicherweise führte die gleichzeitige Inkubation mit CBP zu einer 2-4-fach erhöhten Konzentration des E1A_{12S}-Proteins im CREB-1/DNA-Komplex (Abb. 15B, vgl. Spur 6 mit Spur 5 und Daten nicht gezeigt; densitometrisch bestimmt mit dem LKB UltraScan XL Laser Densitometer). Zusammengefaßt weisen diese Ergebnisse darauf hin, daß CBP entweder den CREB-1/E1A_{12S}-Komplex stabilisiert oder zusätzliches E1A_{12S}-Protein an den E2-CRE-gebundenen Aktivatorkomplex rekrutiert.

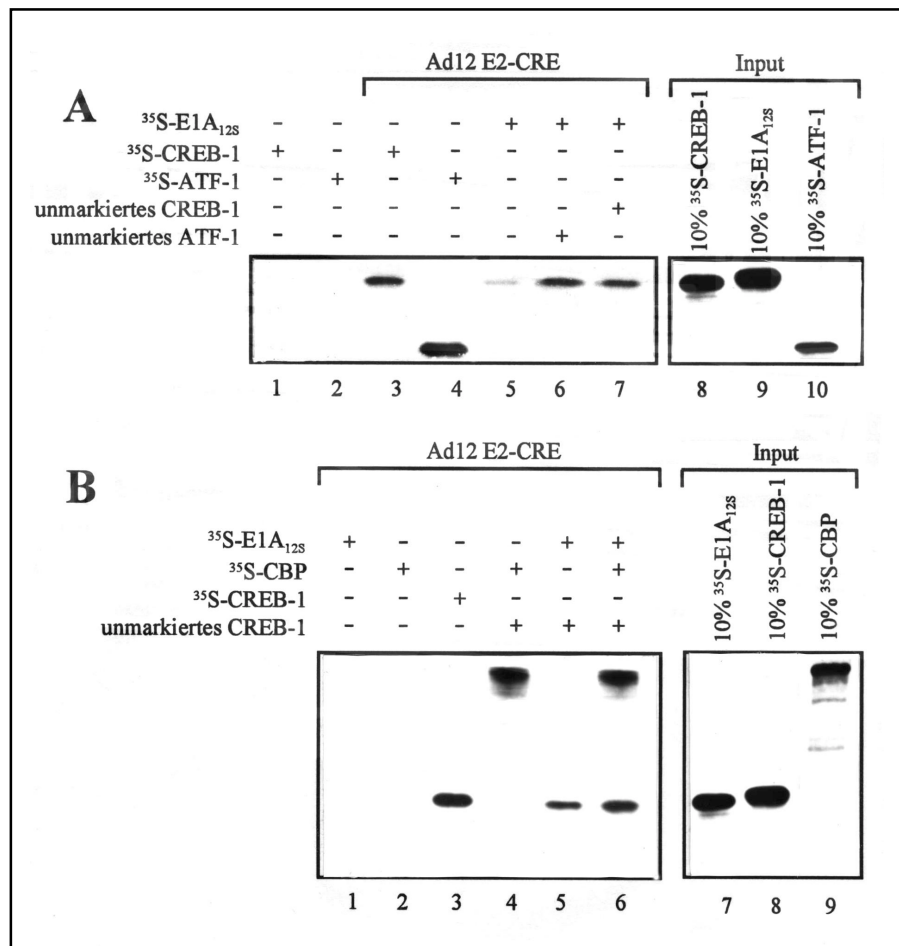


Abb. 15. CREB-1 und ATF-1 rekrutieren das E1A_{12S}-Protein an das E2-CRE. **A.** *In vitro* translatiertes, ³⁵S-markiertes E1A_{12S} wurde mit einem doppelsträngigen, biotinylierten, über Neutravidin-Agarose immobilisierten E2-CRE-Oligonukleotid in Abwesenheit (Spur 5) oder Anwesenheit von *in vitro* translatiertem, unmarkiertem ATF-1 (Spur 6) oder CREB-1 (Spur 7) inkubiert. DNA-gebundene Komplexe wurden auf 10%-SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und durch Fluorographie detektiert. ³⁵S-markiertes CREB-1 in Ab- bzw. Anwesenheit des E2-CRE-Oligonukleotids ist in Spur 1 bzw. Spur 3 dargestellt. ³⁵S-markiertes ATF-1 in Ab- bzw. Anwesenheit des E2-CRE-Oligonukleotids ist in Spur 2 bzw. Spur 4 dargestellt. Die Spuren 8-10 repräsentieren den Input von ³⁵S-CREB-1 (Spur 8), ³⁵S-E1A_{12S} (Spur 9) und ³⁵S-ATF-1 (Spur 10). **B.** Die Menge an rekrutiertem E1A_{12S}-Protein an den CREB-1/DNA-Komplex ist in Anwesenheit von CBP erhöht. *In vitro* translatiertes, ³⁵S-markiertes E1A_{12S} wurde mit unmarkiertem, über das doppelsträngige, biotinylierte E2-CRE-gebundene CREB-1 in Abwesenheit (Spur 5) oder Anwesenheit von *in vitro* translatiertem, ³⁵S-markiertem CBP (Spur 6) inkubiert. DNA-gebundene Komplexe wurden auf 10%-SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und durch Fluorographie detektiert. ³⁵S-E1A_{12S} oder ³⁵S-CBP in Abwesenheit von CREB-1 ist in Spur 1 bzw. Spur 2 gezeigt. ³⁵S-CBP in Anwesenheit von unmarkiertem CREB-1 ist in Spur 4, die Bindung von ³⁵S-CREB-1 an das E2-CRE ist in Spur 3 dargestellt. Die Spuren 7-9 repräsentieren den Input von ³⁵S-E1A_{12S} (Spur 7), ³⁵S-CREB-1 (Spur 8) und ³⁵S-CBP (Spur 9).

4.8 Der CBP-Inhibitor Roscovitine und die Histondeacetylase HDAC-1 inhibieren die E1A_{12S}-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors

Die bisherigen Untersuchungen belegen eine Korrelation zwischen der Bindung des E1A_{12S}-Proteins an die Koaktivatoren p300/CBP und der E1A_{12S}-vermittelten Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors (vgl. Abb. 7B mit Abb. 13; als Zusammenfassung s. Abb. 22; Lipinski *et al.*, 1999 und Daten nicht gezeigt). Da die intrinsische Histonacetyltransferase (HAT)-Aktivität der zellulären Koaktivatoren p300/CBP für die Aktivierung CREB-1/ATF-1-abhängiger Ziel-promotoren essentiell ist (Kurokawa *et al.*, 1998), war es für das Verständnis des

Regulationsmechanismus des $E2_{Ad12}$ -Promotors wichtig zu analysieren, ob diese enzymatische Funktion im Aktivierungsprozeß durch das $E1A_{12S}$ -Protein eine Rolle spielt.

Hierzu wurde zunächst in transienten Expressionsstudien untersucht, ob das $E1A_{12S}$ -Protein den $E2_{Ad12}$ -Promotor in Anwesenheit von Roscovitine transaktiviert. Roscovitine inhibiert die Phosphorylierung von CBP durch CyclinE/cdk2 und dadurch die Aktivierung der HAT-Funktion des Koaktivators (Ait-Si-Ali *et al.*, 1998 und Daten nicht gezeigt). Die $E1A_{12S}$ -vermittelte Aktivierung des $E2_{Ad12}$ -Promotorkonstrukts wurde in Abb. 16A zu 100% gesetzt. Roscovitine inhibierte die $E1A_{12S}$ -abhängige Aktivierung des $E2_{Ad12}$ -Promotorkonstrukts in einem konzentrationsabhängigen Verlauf und reprimierte die CAT-Genexpression bei einer Konzentration von 50 μM vollständig (Abb. 16A).

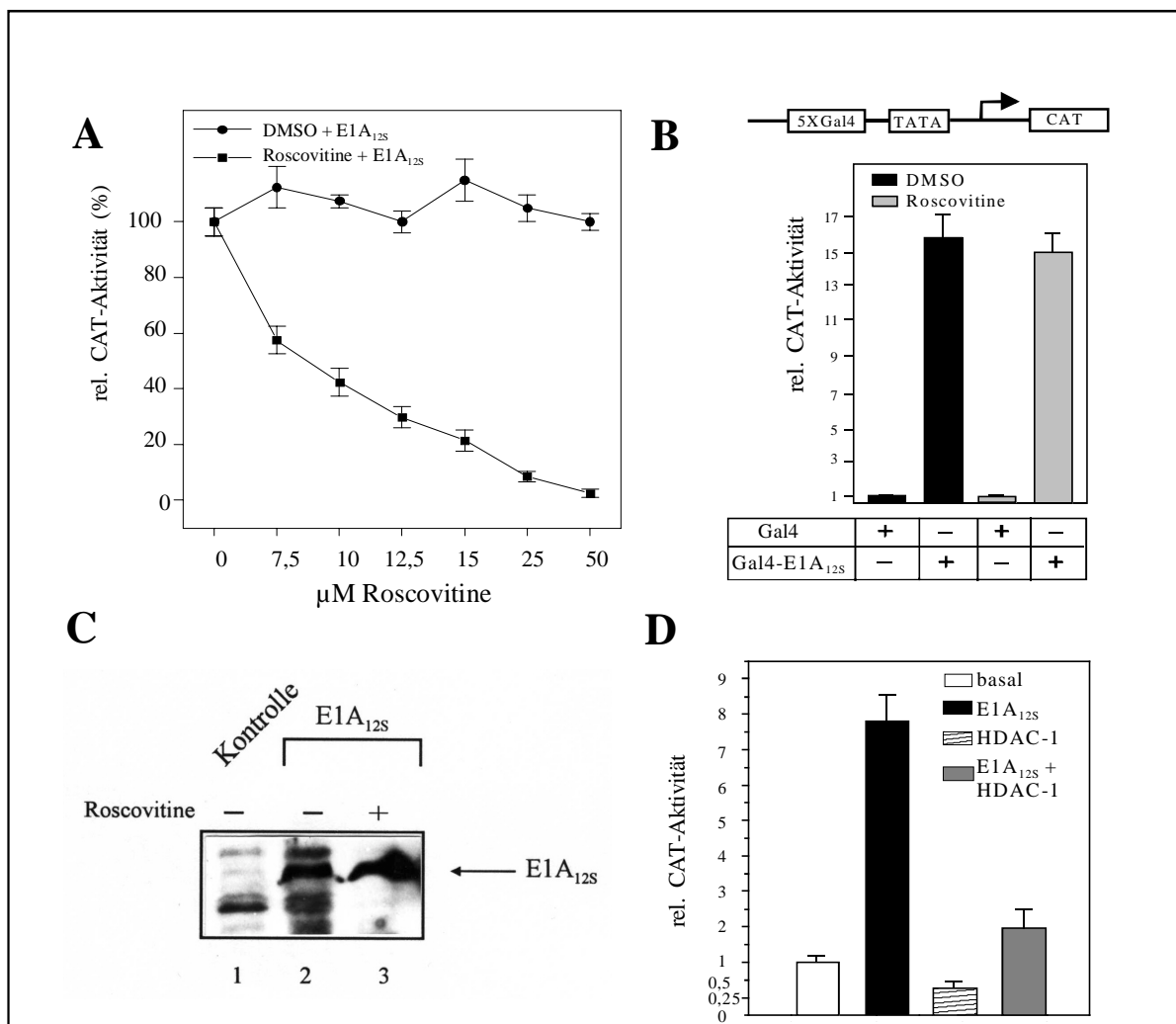


Abb. 16. Deacetylierungsprozesse inhibieren die Aktivierung des $E2_{Ad12}$ -Promotors durch das $E1A_{12S}$ -Protein. **A.** KB-Zellen wurden mit 1 μg des Reporterkonstrukts $E2_{Ad12}$ -CAT und 0,5 μg des Expressionsvektors pRc/RSV- $E1A_{12S}$ kotransfiziert und anschließend in Anwesenheit (■) oder Abwesenheit (●) von Roscovitine kultiviert. Hierzu wurde Roscovitine 10 h nach Transfektionsbeginn in den angegebenen Konzentrationen dem Zellkulturmedium zugegeben. Die CAT-Enzymaktivität wurde 14 h später bestimmt. Die relativen Aktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Transfektionsexperimenten. Die Promotoraktivität des Reporterkonstrukts $E2_{Ad12}$ -CAT in Anwesenheit des Expressionsvektors pRc/RSV- $E1A_{12S}$ ohne Roscovitine wurde zu 100% gesetzt. **B.** KB-Zellen wurden mit 0,2 μg des Reporterkonstrukts G5-E1BTATA-CAT und 1 μg des Gal4- $E1A_{12S}$ -Expressionsvektors oder entsprechendem Leervektor kotransfiziert. Roscovitine wurde 10 h nach Transfektion in einer Konzentration von 25 μM ins Zellkulturmedium gegeben. Die CAT-Enzymaktivität wurde 14 h später bestimmt. Die Promotoraktivität des Reporterkonstrukts G5-E1BTATA-CAT in Anwesenheit des Leervektors wurde als 1 normiert. Das Reporterkonstrukt ist schematisch über der Abbildung **B** dargestellt.

5XGal4 bezeichnet fünf Bindestellen für den Hefetranskriptionsfaktor Gal4. **C.** Expressionsnachweis des E1A_{12S}-Proteins in Roscovitine-behandelten KB-Zellen. Gesamtzellextrakte von Kontroll-transfizierten Zellen oder von pRc/RSV-E1A_{12S}-transfizierten Zellen, die in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) von Roscovitine kultiviert worden waren, wurden mittels Western-Blot mit dem anti-Ad12 E1A-Antiserum analysiert. **D.** HDAC-1 reprimiert die basale wie auch die E1A_{12S}-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors. KB-Zellen wurden mit 1 µg des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT, 1,5 µg pCMV-HA-HDAC-1- und 0,3 µg pRc/RSV-E1A_{12S}-Expressionsvektor wie angegeben kotransfiziert. Die Menge an transfizierter DNA wurde durch die entsprechenden Leervektoren konstant gehalten. Die CAT-Enzymaktivität wurde 24 h nach Transfektionseende bestimmt. Die relativen Aktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Transfektionsexperimenten. Die Promotoraktivität des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT in Anwesenheit der Leervektoren wurde als 1 normiert.

Um auszuschließen, daß Roscovitine die Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors indirekt z. B. durch eine verminderte Expression des E1A_{12S}-Proteins vom kotransfizierten pRc/RSV-E1A_{12S}-Expressionsvektor beeinflusst, wurde das Gal4-Expressionssystem benutzt. Das Reporterkonstrukt G5-E1BTATA-CAT (enthält fünf Bindestellen für den Hefetranskriptionsfaktor Gal4) wurde hierzu mit einem pRc/RSV-Gal4-E1A_{12S}-Expressionsvektor kotransfiziert. Der Expressionsvektor pRc/RSV-Gal4-E1A_{12S} kodiert für ein Fusionsprotein, bestehend aus der Gal4-DNA-Bindungsdomäne und dem E1A_{12S}-Protein, von dem unsere Arbeitsgruppe zeigte, daß es ein starker Aktivator der CAT-Genexpression des Reporterkonstrukts G5-E1BTATA-CAT ist (Lipinski *et al.*, 1997). Die Expression des Gal4-E1A_{12S}-Fusionsproteins wird durch den gleichen RSV-Promotor reguliert wie in dem pRc/RSV-E1A_{12S}-Expressionsvektor. Die transfizierten Zellen wurden anschließend für 10 h in Anwesenheit von 25 µM Roscovitine kultiviert. Wie aus Abb. 16B ersichtlich, wurde die Gal4-E1A_{12S}-abhängige Aktivierung des G5-E1BTATA-Promotorkonstrukts durch Roscovitine nicht inhibiert. Western-Blot-Analysen bestätigten, daß die E1A_{12S}-Proteinexpression in den transfizierten Zellen in An- bzw. Abwesenheit von Roscovitine vergleichbar war (Abb. 16C). Diese Daten deuten an, daß der E2_{Ad12}-Promotor durch einen HAT-abhängigen Prozeß reguliert werden könnte, an dem die intrinsische HAT-Aktivität des Koaktivators CBP beteiligt ist. Da p300 ebenfalls durch CyclinE/cdk2-Komplexe phosphoryliert wird (Kitabayashi *et al.*, 1995), ist zu vermuten, daß Roscovitine auch inhibierend auf die HAT-Aktivität von p300 wirkt.

Zur weiteren Bestätigung, daß Acetylierungsprozesse eine entscheidende Rolle in der E1A_{12S}-vermittelten Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors spielen, wurde der Effekt der Histondeacetylase 1 (HDAC-1) in diesem Prozeß untersucht. Zu diesem Zweck wurde das Reporterkonstrukt E2_{Ad12}-CAT mit Expressionsvektoren für das E1A_{12S}-Protein und HDAC-1 kotransfiziert. Wie Abb. 16D zeigt, reprimierte HDAC-1 sowohl die basale als auch die E1A_{12S}-induzierte CAT-Genexpression. Dieses Ergebnis bestätigt, daß Acetylierungsprozesse eine wichtige Funktion in der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein ausüben.

4.9 Die HDAC-1-vermittelte Repression des E2_{Ad12}-Promotors wird durch die Expression von p300/CBP aufgehoben

Die Tatsache, daß eine Histondeacetylase den E2_{Ad12}-Promotor reprimiert, führte zu der Überlegung, ob die Expression zellulärer Acetylasen diesen Effekt zu kompensieren vermag. Die Daten aus den DNA-abhängigen Protein-Protein-Interaktionsanalysen und den transienten Expressionsanalysen mit dem Acetylase-Inhibitor Roscovitine weisen darauf hin, daß die zellulären Histonacetyltransferasen p300/CBP eine wichtige Funktion in dem Aktivierungsprozeß des viralen Promotors durch das E1A_{12S}-Protein ausüben. Eine interessante Frage ist es daher, ob die Histonacetyltransferasen p300/CBP die HDAC-1-vermittelte Repression aufheben können. Hierzu wurde in transienten Expressionsanalysen das E2_{Ad12}-Promotorkonstrukt mit Expressionsvektoren für HDAC-1, p300/CBP und/oder für das E1A_{12S}-Protein kotransfiziert (Abb. 17). Wie bereits in Abb. 16C gezeigt, reprimierte HDAC-1 die E1A_{12S}-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotorkonstrukts (Abb. 17).

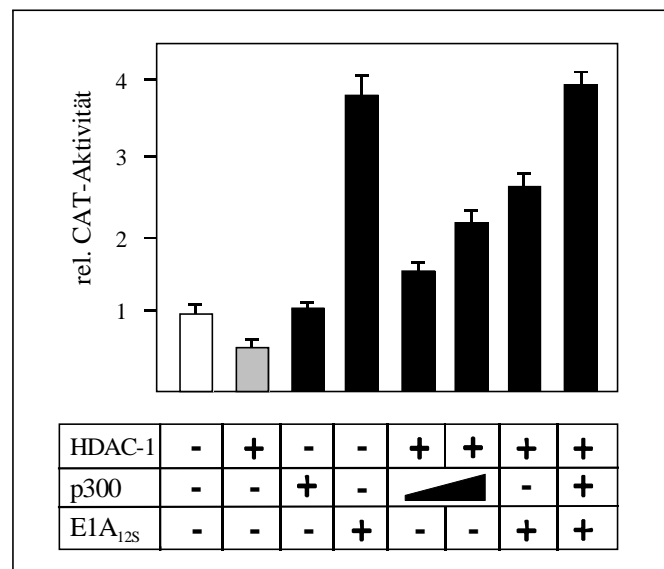


Abb. 17. P300 wirkt der HDAC-1-vermittelten Repression des E2_{Ad12}-Promotors entgegen. KB-Zellen wurden mit 1 µg des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT sowie 1 µg pCMV-HA-HDAC-1-, 0,1-0,2 µg CMVβ-p300- und 0,3 µg pRc/RSV-E1A_{12S}-Expressionsvektor wie angegeben kotransfiziert. Die Menge an transfizierter DNA wurde durch Auffüllen mit den entsprechenden Leervektoren konstant gehalten. Die CAT-Enzymaktivität wurde 24 h nach Transfektionsende bestimmt. Die relativen Aktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Transfektionsexperimenten. Die Promotoraktivität des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT in Anwesenheit der Leervektoren wurde als 1 normiert.

Die Expression von p300/CBP stellte sowohl die Basalaktivität als auch die E1A_{12S}-abhängige Transaktivierung des E2_{Ad12}-Promotors in Anwesenheit der Deacetylase HDAC-1 wieder her (Abb. 17 und Daten nicht gezeigt). Interessanterweise aktivierten p300/CBP den E2_{Ad12}-Promotor in Abwesenheit von HDAC-1 nicht, was darauf hindeutet, daß die endogene Koaktivatorkonzentration erst in Anwesenheit von überexprimiertem HDAC-1 limitierend in Bezug auf die E2_{Ad12}-Promotoraktivierung wird (Abb. 17 und Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Chen *et al.* (1999), in deren Verlauf die Hormon-induzierte Genexpression durch p300 analysiert wurde.

Zusammenfassend bekräftigen diese Daten, daß die Acetyltransferaseaktivität von p300/CBP im Aktivierungsprozeß des E2_{Ad12}-Promotors eine entscheidende Funktion ausübt.

4.10 Das Histonprotein H4 wird im Prozeß der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors acetyliert

Nach der adenoviralen Infektion einer Zelle wird die virale DNA, wie auch transient transfizierte DNA, durch die Wechselwirkung mit zellulären Histonen in eine nukleosomenartige Struktur verpackt (Dery *et al.*, 1985; Luo *et al.*, 1998). Die nukleosomale Struktur reprimiert die Initiation der Transkription durch das RNA-Polymerase II-Holoenzym am Zielpromotor (Kornberg und Lorch, 1999). Die Acetylierung von Histonen durch Histonacetyltransferasen führt jedoch zu einer Destabilisierung der repressiv wirkenden nukleosomalen Struktur und ermöglicht dadurch eine verbesserte Zugänglichkeit des Promotors für Transkriptionsfaktoren und dem generellen Transkriptionsapparat.

Da die Aktivität des viralen E2_{Ad12}-Promotors durch eine Acetylase und eine Deacetylase reguliert wird, wurde untersucht, ob der E2_{Ad12}-Promotor mit acetylierten Histonen *in vivo* assoziiert vorliegt. Diese Fragestellung wurde durch Chromatin-Immunpräzipitationen analysiert. Hierzu wurde das E2_{Ad12}-Reporterkonstrukt in KB-Zellen transfiziert und mit einem anti-acetyl Histon H4-Antiserum immunpräzipitiert (s. Kap. 3.7.3). Die präzipitierte E2_{Ad12}-Promotor-DNA wurde anschließend mit spezifischen Oligonukleotiden für den E2_{Ad12}-Promotor über PCR detektiert. Wie aus Abb. 18 (Spur 5) ersichtlich, ist der E2_{Ad12}-Promotor mit acetyliertem Histon H4 assoziiert.

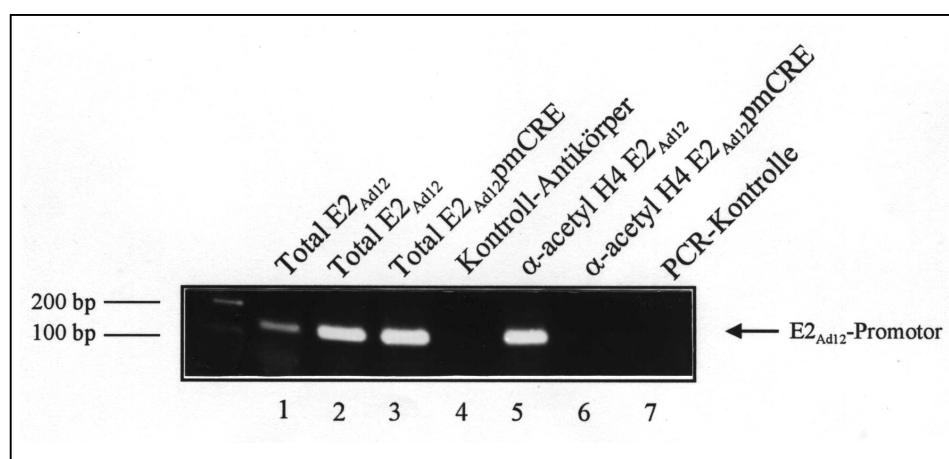


Abb. 18. Der E2_{Ad12}-Promotor ist *in vivo* mit acetyliertem Histon H4 assoziiert. KB-Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt E2_{Ad12}-CAT (Spuren 1, 2, 4 und 5) oder mit dem Reporterkonstrukt E2_{Ad12}pmCRE-CAT (Spuren 3 und 6) transfiziert. 40 h nach Transfektionsbeginn wurde die DNA präpariert, ultraschallbehandelt, mit einem anti-acetyl H4-Antiserum (Spuren 5 und 6) oder Kontroll-Antiserum (normales Kaninchen IgG, Spur 4) immunpräzipitiert und durch PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für den E2_{Ad12}-Promotor analysiert. Aliquots der ultraschallbehandelten DNA wurden vor der Immunpräzipitation analysiert (Total; Spuren 1, 2 und 3). Die Positionen der E2_{Ad12}-Promotorfragmente ist rechts, der Molekulargewichtstandard links angegeben. Spur 7 zeigt die PCR-Kontrolle ohne DNA.

Interessanterweise konnte die Promotormutante E2_{Ad12}pmCRE-CAT, die Punktmutationen im E2-CRE enthält und in den transienten Expressionsanalysen keine

induzierbare Promotoraktivität besitzt (Abb. 6), nicht mit dem anti-acetyl H4-Antiserum präzipitiert werden (Abb. 18, Spur 6). Das deutet darauf hin, daß der transkriptionsinaktive Promotor nicht mit acetyliertem Histon H4 *in vivo* assoziiert ist, möglicherweise bedingt durch das Fehlen der Bildung des Transaktivorkomplexes bestehend aus CREB-1/ATF-1, dem E1A_{12S}-Protein und den Acetylasen p300/CBP. Da ein Kontroll-Antikörper nicht zu einer Präzipitation des E2_{Ad12}-Promotors führte (Abb. 18, Spur 4), wurde aus diesen Ergebnissen geschlossen, daß Acetylierungsprozesse, zumindest des Histonproteins H4, eine wichtige Funktion in der Transkriptionsaktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein ausüben.

4.11 Das E1A_{12S}-Protein moduliert die HAT-Aktivität von p300/CBP

Die Ergebnisse der Chromatin-Immunpräzipitationen und der transienten Expressionsanalysen mit der Histondeacetylase HDAC-1 zeigten einen Zusammenhang zwischen der Histonacetylierung und der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein. Entscheidend war hier, daß die Acetylasen p300/CBP einer HDAC-1-vermittelten Repression des E2_{Ad12}-Promotors entgegenwirken. Aufgrund dieser Daten wurde angenommen, daß die HAT-Funktion von p300/CBP im Aktivierungsprozeß des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein wichtig ist. In der Literatur sind jedoch kontroverse Daten bezüglich der Modulation der HAT-Aktivität der zellulären Koaktivatoren p300/CBP durch Adenovirus E1A-Proteine beschrieben (s. Kap. 1.4.2; Bannister und Kouzarides, 1996; Ait-Si-Ali *et al.*, 1998; Chakravarti *et al.*, 1999; Hamamori *et al.*, 1999). Da aber eine generelle Inhibition der HAT-Funktion von p300/CBP durch die adenoviralen Proteine einer Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors nach den bisher präsentierten Daten entgegenwirken würde, sollte zunächst geklärt werden, ob ein Komplex bestehend aus p300/CBP und dem E1A_{12S}-Protein weiterhin eine HAT-Funktion besitzt und ob diese auch in Anwesenheit des adenoviralen Proteins aktiv ist. Dies wurde zuerst durch kombinierte GST-Fusionsprotein-Interaktions-/HAT-Analysen untersucht. Ein GST-E1A_{12S}-Fusionsprotein oder die davon abgeleitete Proteinmutante GST-Δ1-79/E1A_{12S} wurde mit einem Gesamtzellextrakt von KB-Zellen inkubiert und gebundene Proteine in HAT-Analysen mit einem H4-Peptid (s. Kap. 3.6.9.4) oder einem Histongemisch (bestehend aus den Histonen H3, H2A, H2B und H4; s. Kap. 3.6.9.5) als Substrat eingesetzt. Diese Experimente erbrachten den Nachweis, daß das GST-E1A_{12S}-Fusionsprotein mit zellulären Faktoren interagiert, welche die Histone H3 und H4 acetylierten (Abb. 19A und 19B, Spur 2). Da weder das E1A_{12S}-Protein eine HAT-Funktion besitzt (Daten nicht gezeigt) noch die GST-Proteindomäne mit zellulären Histonacetyltransferasen interagiert (Abb. 19A und Abb. 19B, Spur 1), deutet dies an, daß die gemessene HAT-Aktivität durch die Bindung von zellulären Faktoren an den adenoviralen Anteil des Fusionproteins zustande kommt.

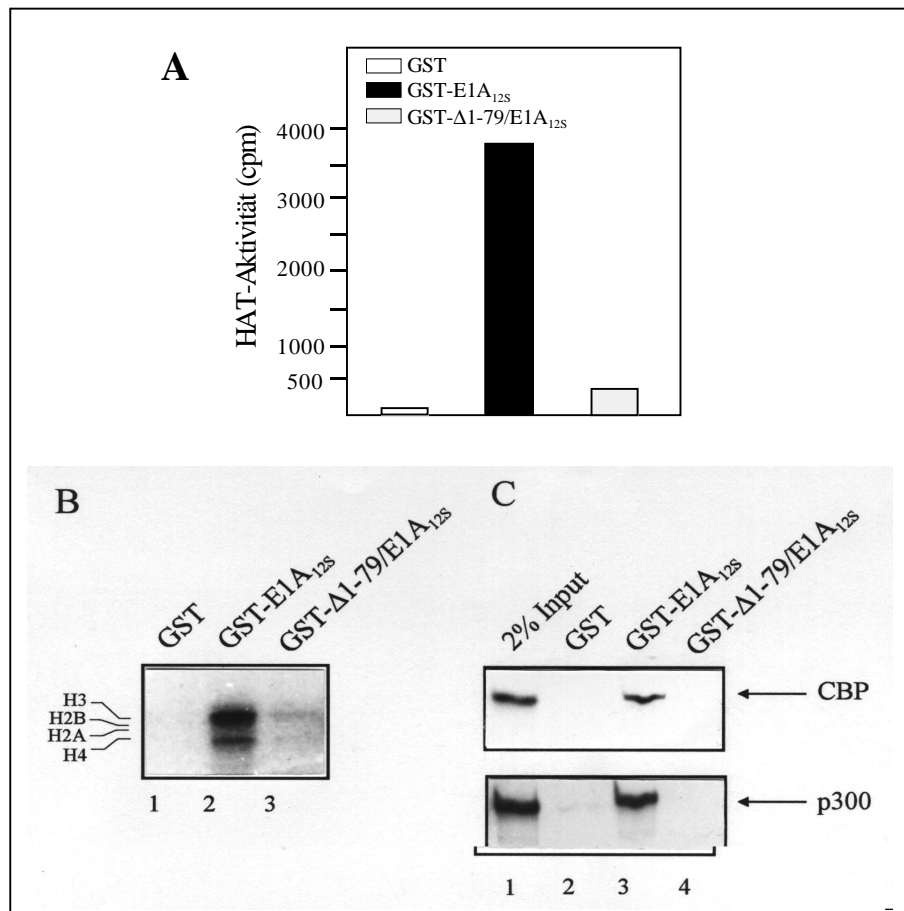


Abb. 19. E1A_{12S}-komplexiertes p300/CBP besitzt eine aktive HAT-Funktion. **A.** GST-E1A_{12S}, GST-Δ1-79/E1A_{12S} oder die GST-Proteindomäne, an Glutathion-Sepharose immobilisiert, wurden mit Gesamtzellextrakt von KB-Zellen inkubiert. Gebundene Komplexe wurden anschließend in HAT-Experimenten mit [¹⁴C]-Acetyl-CoA und einem biotinylierten synthetischen Peptid bestehend aus den ersten 24 Aminosäuren des Histons H4 (**A**) oder Kalbsthymus-Histonen (**B**) als Substrat analysiert. **A.** Das acetylierte Peptid wurde über Streptavidin-Agarose immobilisiert und die inkorporierte Radioaktivität durch Flüssigkeitsszintillation bestimmt. **B.** Acetylierte Histone wurden auf einem 18%-SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Fluorographie detektiert. **C.** Aliquots der GST-Fusionsprotein-Interaktionsexperimente wurden mittels Western-Blot mit einem anti-CBP- oder anti-p300-Antiserum analysiert. Spur 3 zeigt die über das E1A_{12S}-Protein (GST-E1A_{12S}) gebundenen Proteine, Spur 4 zeigt die E1A_{12S}-Proteinmutante GST-Δ1-79/E1A_{12S} (deletiert sind der N-Terminus und die CR1-Domäne) und Spur 2 zeigt die GST-Proteindomäne. Spur 1 zeigt einen Western-Blot von 2% des in den GST-Fusionsprotein-Interaktionsexperimenten eingesetzten KB-Gesamtzellextrakts. Die Positionen von CBP und p300 sind rechts angegeben.

Zur Identifizierung dieser zellulären Acetyltransferasen wurden Aliquots der GST-Fusionsprotein-Interaktionsexperimente mittels Western-Blot analysiert. Erwartungsgemäß präzipitierte das E1A_{12S}-Protein die zellulären Acylasen p300/CBP (Abb. 19C, Spur 3), wogegen die E1A_{12S}-Proteinmutante GST-Δ1-79/E1A_{12S}, welcher die p300/CBP-Interaktionsdomänen (Aminosäuren 1-79) deletiert wurde, nicht mehr mit diesen Koaktivatoren interagiert (Abb. 19C, Spur 4). Diese E1A_{12S}-Proteinmutante war zudem nicht mehr in der Lage, mit einer nachweisbaren HAT-Aktivität zu assoziieren (Abb. 19A und Abb. 19B, Spur 3). Der p300/CBP-assoziierte Kofaktor P/CAF, der mit dem E1A_{12S}-Protein interagiert und der ebenfalls eine intrinsische HAT-Aktivität besitzt (Reid *et al.*, 1998), war hingegen in den Western-Blot-Analysen nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Diesen Untersuchungen deuten an, daß Komplexe bestehend aus p300/CBP und dem E1A_{12S}-Protein weiterhin eine Acetylasefunktion aufweisen und somit in der Lage sind,

Histone zu acetylieren. Jedoch kann aufgrund dieser Daten nicht ausgeschlossen werden, daß neben p300/CBP, bis heute unbekannte Acetylasen, die ebenfalls mit dem E1A_{12S}-Protein interagieren, eine Rolle im Aktivierungsprozeß des E2_{Ad12}-Promotors spielen.

Zur weiteren Analyse des Einflusses einer direkten Interaktion zwischen dem E1A_{12S}-Protein und p300/CBP und damit auf die enzymatische Aktivität dieser zellulären Koaktivatoren, wurden HAT-Analysen mit rekombinant aufgereinigten GST-CBP₁₋₁₈₉₀- und His₆-E1A_{12S}-Fusionsproteinen durchgeführt. Das GST-Fusionsprotein CBP₁₋₁₈₉₀ besteht aus dem N-terminalen Bereich von CBP einschließlich der HAT-Domäne und der E1A_{12S}-Bindedomäne C/H3 (Lipinski *et al.*, 1999). Die HAT-Aktivität dieses Fusionsproteins wurde als 1 normiert (Abb. 20A). Steigende Mengen des His₆-E1A_{12S}-Proteins führten zu einer 2,4-fachen Induktion der HAT-Aktivität des GST-CBP₁₋₁₈₉₀-Proteins (Abb. 20A). Interessanterweise verursachte ein deutlicher Überschuß des His₆-E1A_{12S}-Proteins eine 2-fache Repression der HAT-Aktivität des GST-CBP₁₋₁₈₉₀-Proteins (Abb. 20A). Kontrollexperimente mit der GST-Proteindomäne oder dem His₆-E1A_{12S}-Protein bestätigten, daß keines dieser Proteine eine detektierbare HAT-Aktivität aufweist (Daten nicht gezeigt).

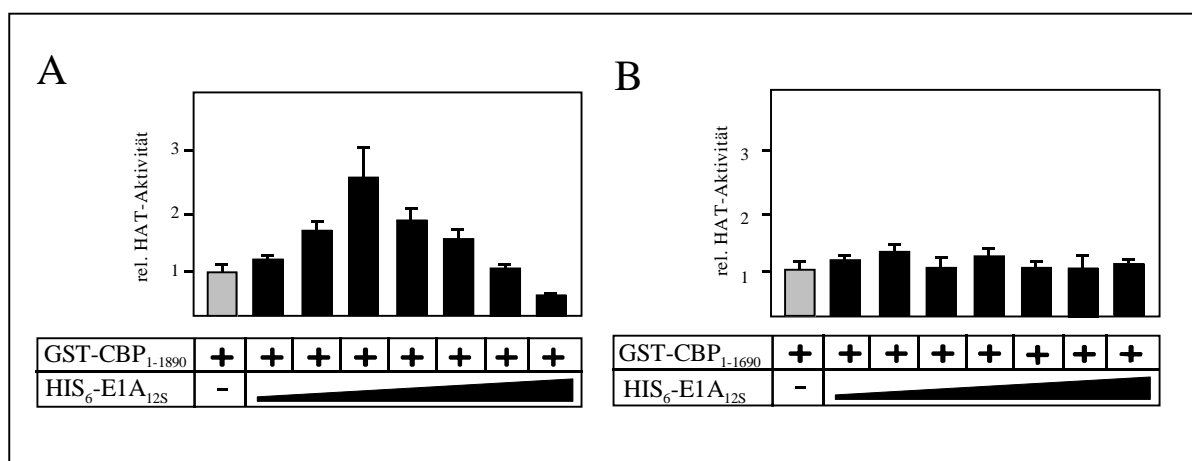


Abb. 20. Das E1A_{12S}-Protein moduliert die HAT-Aktivität von CBP. GST-CBP₁₋₁₈₉₀ (A) oder GST-CBP₁₋₁₆₉₀ (deletiert ist der C-Terminus einschließlich der C/H3-Domäne) (B) wurden in HAT-Experimenten mit steigenden Konzentrationen des His₆-E1A_{12S}-Proteins in Anwesenheit von [¹⁴C]-Acetyl-CoA und einem biotinylierten synthetischen Peptid bestehend aus den ersten 24 Aminosäuren des Histons H4 als Substrat inkubiert. Das acetylierte Peptid wurde über Streptavidin-Agarose immobilisiert und die inkorporierte Radioaktivität durch Flüssigkeitsszintillation bestimmt. Die HAT-Aktivität der GST-CBP-Fusionsproteine in Abwesenheit des His₆-E1A_{12S}-Proteins wurde als 1 normiert.

Weiterhin konnte in den HAT-Analysen mit der CBP-Proteinmutante GST-CBP₁₋₁₆₉₀ (deletiert ist der C-Terminus einschließlich der E1A_{12S}-Bindedomäne C/H3), die eine vergleichbare HAT-Aktivität wie das GST-CBP₁₋₁₈₉₀-Protein in Abwesenheit des viralen Proteins besitzt (Daten nicht gezeigt), nachgewiesen werden, daß die HAT-Aktivität dieses Proteins nicht mehr durch das His₆-E1A_{12S}-Protein regulierbar war (Abb. 20B). Aufgrund dieser Ergebnisse kann geschlossen werden, daß das E1A_{12S}-Protein die HAT-Aktivität von CBP durch eine direkte Interaktion konzentrationsabhängig beeinflusst.

4.12 Die E1A_{12S}-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors korreliert mit der Fähigkeit des viralen Proteins mit der HAT-Funktion von p300/CBP *in vivo* zu assoziieren

Die bisherigen *in vitro*-Interaktionsanalysen deuten an, daß Komplexe bestehend aus p300/CBP und dem E1A_{12S}-Protein in der Lage sind, Histone zu acetylieren. Um die funktionelle Bedeutung der Histonacetyltransferase-Aktivität von p300/CBP im Zuge der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein zu analysieren, war es wichtig zu klären, ob native zelluläre Proteinkomplexe aus p300/CBP und dem adenoviralen Protein eine Acetyltransferase-Aktivität aufweisen. Zu diesem Zweck wurden COS7-Zellen mit Expressionsvektoren entweder für ein myc-Epitop gekoppeltes E1A_{12S}-Wildtyp-Protein oder davon abgeleiteten Proteinmutanten, die in ihrem Bindungsverhalten zu p300/CBP verändert sind (Abb. 13; Lipinski *et al.*, 1999), transfiziert. Immunkomplexe wurden mit einem gegen das myc-Epitop gerichteten Antikörper präzipitiert und auf ihre assoziierte HAT-Aktivität hin analysiert. In diesen Analysen zeigte sich, daß das E1A_{12S}-Wildtyp-Protein sowie die Proteinmutanten RG2/E1A_{12S} und DA24/E1A_{12S} eine starke HAT-Aktivität präzipitierten (Abb. 21).

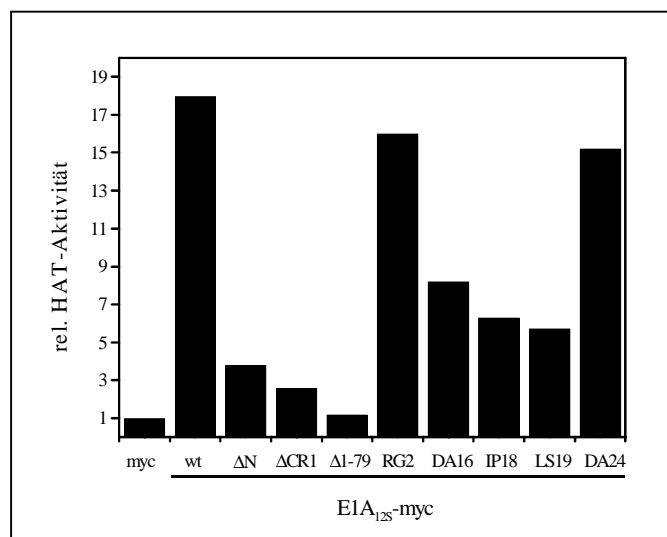


Abb. 21. Das E1A_{12S}-Protein assoziiert mit einer HAT-Aktivität in Abhängigkeit seiner p300/CBP-Bindedomänen *in vivo*. COS7-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für ein myc-gekoppeltes E1A_{12S}-Wildtyp-Protein oder davon abgeleiteten Proteinmutanten wie angegeben transfiziert. Die Zellen wurden 48 h später lysiert und die Gesamtzellextrakte mit einem anti-myc-Antikörper inkubiert. Immunkomplexe wurden anschließend in HAT-Experimenten mit [¹⁴C]-Acetyl-CoA und einem biotinylierten synthetischen Peptid bestehend aus den ersten 24 Aminosäuren des Histons H4 als Substrat analysiert. Das acetylierte Peptid wurde über Streptavidin-Agarose immobilisiert und die inkorporierte Radioaktivität durch Flüssigkeitsszintillation bestimmt. Die HAT-Aktivität von Kontroll-transfizierten Zellen (myc) wurde als 1 normiert.

Die E1A_{12S}-Proteinmutanten ΔN/E1A_{12S}, ΔCR1/E1A_{12S} sowie Δ1-79/E1A_{12S} hatten dagegen ihre Fähigkeit nahezu verloren, mit einer HAT-Aktivität zu assoziieren und die E1A_{12S}-Proteinmutanten DA16/E1A_{12S}, IP18/E1A_{12S} und LS19/E1A_{12S} zeigten eine stark reduzierte Bindung einer HAT-Aktivität (Abb. 21). Western-Blot-Analysen der für die Immunpräzipitationen eingesetzten Gesamtzellextrakte bestätigten, daß das E1A_{12S}-Protein und davon abgeleiteten Proteinmutanten in vergleichbaren Konzentrationen in den

transfizierten COS7-Zellen vorhanden waren (Abb. 7C und Daten nicht gezeigt), so daß ein Verlust oder eine Reduktion der Bindung an eine HAT-Aktivität *in vivo* nicht auf unterschiedliche Mengen der E1A_{12S}-Proteine in den Zellen zurückzuführen ist.

Zusammenfassend zeigen die Daten, daß die Assoziation der analysierten E1A_{12S}-Proteine mit einer HAT-Aktivität *in vitro* und *in vivo* eindeutig mit einer Bindungsmotiv-abhängigen Interaktion des E1A_{12S}-Proteins mit den zellulären Acetylase p300/CBP und der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors korreliert (Abb. 22). Das E1A_{12S}-Wildtyp-Protein sowie die Proteinmutanten RG2/E1A_{12S} und DA24/E1A_{12S} interagieren mit p300/CBP, transaktivieren den E2_{Ad12}-Promotor und assoziieren mit einer HAT-Aktivität.

E1A _{12S} - Protein	Aktivierung des E2 _{Ad12} -Promotors	Assoziierte HAT-Aktivität <i>in vivo</i>	Interaktion mit p300/CBP <i>in vivo</i>
wt E1A _{12S}	+++	+++	+++
ΔN/E1A _{12S}	-	-	-
ΔCR1/E1A _{12S}	-	-	+
Δ1-79/E1A _{12S}	-	-	-
RG2/E1A _{12S}	+++	+++	+++
DA16/E1A _{12S}	+	+	-
IP18/E1A _{12S}	-	+	-/+
LS19/E1A _{12S}	-	+	-/+
DA24/E1A _{12S}	+++	+++	+++

Abb. 22. Die Assoziation des E1A_{12S}-Proteins mit einer HAT-Aktivität *in vivo* korreliert mit seiner Bindung an p300/CBP und der Transaktivierung des E2_{Ad12}-Promotors. Die Fähigkeit des E1A_{12S}-Wildtyp-Proteins oder der davon abgeleiteten Proteinmutanten, den E2_{Ad12}-Promotor zu transaktivieren und mit p300/CBP *in vivo* zu interagieren, sind aus den Abb. 7B und 13 entnommen. Die Assoziation des E1A_{12S}-Wildtyp-Proteins bzw. der E1A_{12S}-Proteinmutanten mit einer HAT-Aktivität *in vivo* ist in Abb. 21 dargestellt. +++, starke Interaktion des E1A_{12S}-Wildtyp-Proteins bzw. der E1A_{12S}-Proteinmutante mit p300/CBP, starke Transaktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Wildtyp-Protein bzw. die E1A_{12S}-Proteinmutante und starke Assoziation mit einer HAT-Aktivität. +, sehr schwache Interaktion der E1A_{12S}-Proteinmutante mit p300/CBP, sehr schwache Transaktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch die E1A_{12S}-Proteinmutante und sehr schwache Assoziation mit einer HAT-Aktivität. -/+, marginale Interaktion der E1A_{12S}-Proteinmutante mit p300/CBP. -, Interaktion mit p300/CBP, Transaktivierung des E2_{Ad12}-Promotors und Assoziation mit einer HAT-Aktivität der E1A_{12S}-Proteinmutante nicht detektierbar.

Dagegen sind die Proteinmutanten ΔN/E1A_{12S}, ΔCR1/E1A_{12S} und Δ1-79/E1A_{12S} nicht mehr in der Lage an p300/CBP zu binden, liegen nicht mit einer HAT-Aktivität assoziiert vor und aktivieren nicht mehr den E2_{Ad12}-Promotor. Interessanterweise können die Proteinmutanten DA16/E1A_{12S}, IP18/E1A_{12S} und LS19/E1A_{12S}, die eine marginale oder keine Affinität zu p300/CBP aufweisen und kein transaktivierendes Potential auf dem E2_{Ad12}-Promotor besitzen, nur mit einer residualen HAT-Aktivität assoziieren (Abb. 21 und Abb. 22). Diese verbliebene HAT-Aktivität ist möglicherweise auf andere zelluläre Acetylase wie beispielsweise P/CAF zurückzuführen (Reid *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1996), die durch die E1A_{12S}-Proteinmutanten anstelle von p300/CBP präzipitiert werden. Diese Daten unterstützen die Annahme, daß die Rekrutierung oder die Bindung der Acetyltransferasefunktion von

p300/CBP an das E2-CRE durch das adenovirale Protein ein entscheidender Schritt im Prozeß der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotor ist (s. Kap. 5.1).

4.13 Inhibitoren des cAMP/PKA-abhängigen Signaltransduktionswegs wirken der Transaktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein entgegen

Die transienten Expressionsanalysen mit dem PKA-spezifischen Inhibitor PKI zeigten, daß dieser Inhibitor die E1A_{12S}-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors reprimiert (Abb. 9). Durch PKI kommt es zu einem Transport der katalytischen Untereinheit (C-Untereinheit) der PKA aus dem Zellkern. Dadurch wird die C-Untereinheit-vermittelte Phosphorylierung eines oder mehrerer zellulärer Faktoren, die eine wichtige Funktion in der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein ausüben, verhindert. Da der E2_{Ad12}-Promotor über das E2-CRE reguliert wird, an dem die cAMP/PKA-abhängigen Transkriptionsfaktoren CREB-1 und ATF-1 binden (s. Kap. 4.3 und 4.7), könnten diese Faktoren ein Ziel der Phosphotransferase-Aktivität der C-Untereinheit sein. Neben diesen Transkriptionsfaktoren besteht darüber hinaus die Möglichkeit, daß die Koaktivatoren p300/CBP oder andere promotorgebundene Faktoren wie Komponenten des generellen Transkriptionsapparats durch die C-Untereinheit im Aktivierungsprozeß des viralen Promotors phosphoryliert werden (als Referenz s. Xu *et al.*, 1998; Kwok *et al.*, 1994).

Zur weiteren Bestätigung, daß die Phosphotransferase-Aktivität der C-Untereinheit von Bedeutung für die Transkriptionsaktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein ist, wurden transiente Expressionsanalysen mit dem PKA-spezifischen Inhibitor H-89 durchgeführt. H-89 ist ein synthetisches ATP-Analogon, welches mit endogenem ATP um die Bindung an die ATP-Bindestelle der C-Untereinheit kompetiert (Chijiwa *et al.*, 1990). Die Bindung von H-89 an die ATP-Bindestelle inhibiert dadurch die Phosphotransferase-Aktivität der C-Untereinheit.

Für die transienten Expressionsstudien wurde das E2_{Ad12}-CAT-Reporterkonstrukt mit einem E1A_{12S}-Expressionsvektor kotransfiziert. Die transfizierten Zellen wurden anschließend für 12 h in Anwesenheit des Inhibitors H-89 kultiviert. Wie aus Abb. 23 ersichtlich, inhibierte H-89 sowohl die basale als auch die E1A_{12S}-induzierte CAT-Genexpression des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT.

Diese Ergebnisse, die in Übereinstimmung mit den PKI-Daten liegen, bekräftigen, daß die Phosphotransferase-Aktivität der PKA C-Untereinheit und damit die Phosphorylierung eines oder mehrerer Faktoren für die Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein wichtig ist. Zudem unterstützen die Analysen mit den beiden spezifischen PKA-Inhibitoren PKI und H-89 die Vermutung, daß das PKA-Holoenzym eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das adenovirale Protein spielt.

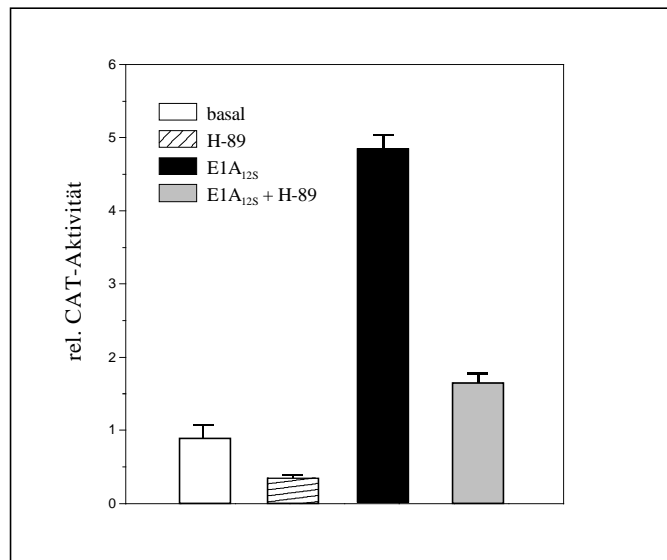


Abb. 23. Der PKA-spezifische Inhibitor H-89 verhindert die E1A_{12S}-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors. KB-Zellen wurden mit 1 µg des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT und 0,5 µg pRc/RSV-Leervektor oder pRc/RSV-E1A_{12S}-Expressionsvektor kotransfiziert. H-89 wurde 12 h nach Transfektionsbeginn in einer Konzentration von 10 µM dem Zellkulturmedium zugegeben. Die CAT-Enzymaktivität wurde 12 h später bestimmt. Die relativen Aktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Transfektionsexperimenten. Die Promotoraktivität des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT in Anwesenheit des Leervektors pRc/RSV wurde als 1 normiert.

Aufgrund dieser Annahme wurde untersucht, ob das E1A_{12S}-Protein in den cAMP/PKA-abhängigen Signaltransduktionsweg an einer zweiten Stelle dieser Signalkaskade eingreift und hierdurch die Transkription des E2_{Ad12}-Promotors aktiviert. Denkbar wäre, daß das E1A_{12S}-Protein mit den R-Untereinheiten des PKA-Holoenzym im Cytoplasma interagiert und dadurch eine cAMP-unabhängige Freisetzung der C-Untereinheit bewirkt. Die daraus resultierende Translokation der C-Untereinheit würde z. B. zu einer Phosphorylierung und Stimulation der zellulären Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1 oder der Koaktivatoren p300/CBP führen, die für eine effiziente Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors notwendig wäre. In Übereinstimmung mit dieser Vermutung inhibieren PKI und H-89 die E1A_{12S}-vermittelte Aktivierung des viralen Promotors.

Um eine mögliche Interaktion des E1A_{12S}-Proteins mit dem cytoplasmatisch-lokalisieren PKA-Holoenzym zu untersuchen, wurden zuerst transiente Expressionsanalysen mit Expressionsvektoren für Verankerungsinhibitor-Peptide des PKA-Holoenzym durchgeführt. Diese Peptide stellen kompetitive Inhibitoren der R/AKAP-Interaktion *in vivo* dar (Harada *et al.*, 1999; Lester *et al.*, 1997; s. Kap. 1.5). Da die subzelluläre Lokalisation des PKA-Holoenzym durch die AKAPs für die Aktivierung cAMP-abhängiger Prozesse essentiell ist, resultiert eine Aufhebung der subzellulären Lokalisation des PKA-Holoenzym durch diese kompetitiven Inhibitoren in einer Repression cAMP-abhängiger Prozesse (Lester *et al.*, 1997). Wenn somit der zweite Aktivierungsschritt des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein über eine Interaktion mit dem verankerten PKA-Holoenzym erfolgt, sollten PKA-Verankerungsinhibitoren der E1A_{12S}-vermittelten Aktivierung des viralen Promotors entgegenwirken.

Die Transfektion eines Expressionsvektors für das Peptidfragment des dual-spezifischen Verankerungsproteins AKAP149 (auch als D-AKAP-1/S-AKAP84 bezeichnet), welches die RI- und RII-Interaktionsdomäne umspannt (As 326-425; Huang *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1995; Trendelenburg *et al.*, 1996), führte zu einer Reduktion der E2_{Ad12}-Promotoraktivität in Anwesenheit des E1A_{12S}-Proteins (Abb. 24A).

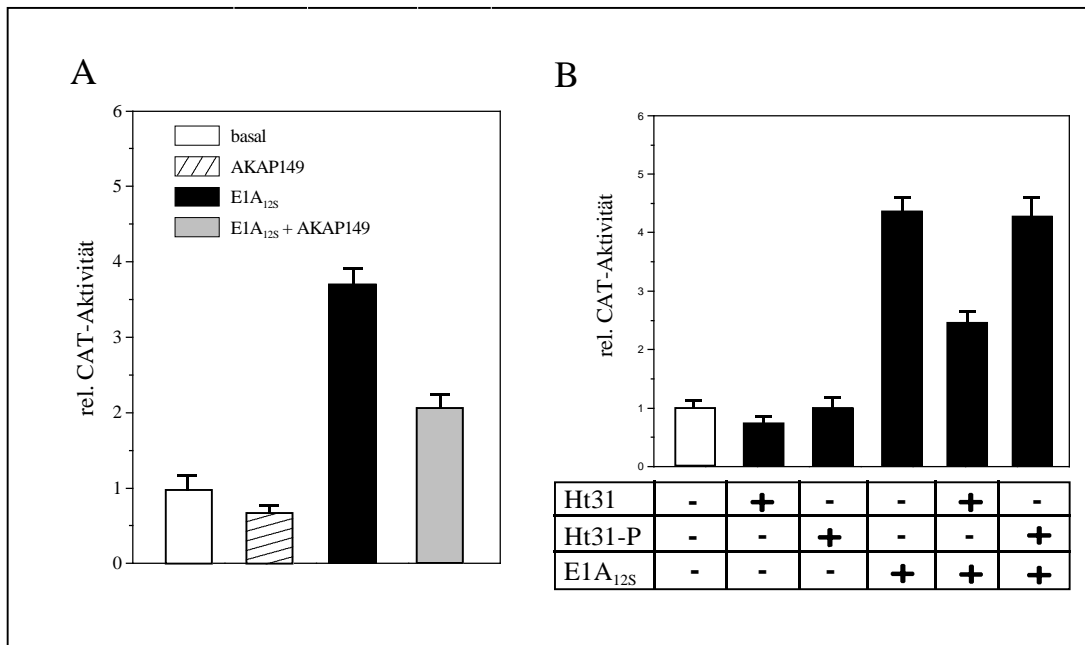


Abb. 24. Die Verankerungsinhibitoren des PKA-Holoenzym AKAP149 und Ht31 wirken der E1A_{12S}-induzierten Transkriptionsaktivierung des E2_{Ad12}-Promotors entgegen. **A.** KB-Zellen wurden mit 1 µg des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT sowie 0,3 µg pRc/RSV-E1A_{12S}- und 1,5 µg pRc/RSV-AKAP149-Fragment-Expressionsvektor (enthält die RI- und RII-Interaktionsdomäne von As 326-425 des dual-spezifischen AKAP149; Huang *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1995; Trendelenburg *et al.*, 1996) kotransfiziert. Die Menge an transfizierter DNA wurde durch Auffüllen mit dem Leervektor pRc/RSV konstant gehalten. Die CAT-Enzymaktivität wurde 24 h später bestimmt. Die relativen Aktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Transfektionsexperimenten. Die Promotoraktivität des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT in Anwesenheit des Leervektors pRc/RSV wurde als 1 normiert. **B.** KB-Zellen wurden mit 1 µg des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT sowie 0,3 µg pRc/RSV-E1A_{12S}-, 1 µg pcDNA3.1-Ht31-Fragment- (enthält As 418-718 des humanen Schilddrüsen-Verankerungsprotein Ht31 einschließlich der RII-Bindedomäne von As 493-515; Lester *et al.*, 1997) und pcDNA3.1-Ht31-P-Fragment- Expressionsvektor (entspricht Ht31, enthält aber einen Aminosäureaustausch an Position 502 von Serin nach Prolin in der RII-Bindedomäne; Lester *et al.*, 1997) kotransfiziert. Die Menge an transfizierter DNA wurde durch Auffüllen mit den entsprechenden Leervektoren konstant gehalten. Die CAT-Enzymaktivität wurde 24 h später bestimmt. Die relativen Aktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Transfektionsexperimenten. Die Promotoraktivität des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT in Anwesenheit der Leervektoren pcDNA3.1 und pRc/RSV wurde als 1 normiert.

Ein vergleichbares Ergebnis wurde durch die Transfektion eines Expressionsplasmids für das Peptidfragment Ht31, welches die As 418-718 des humanen Schilddrüsen-Verankerungsproteins Ht31 einschließlich der RII-Bindedomäne von As 493-515 enthält (Lester *et al.*, 1997), erzielt (Abb. 24B). Die Expression des Peptidfragments Ht31-P, in der das RII-AKAP-Bindungsmotiv des humanen Schilddrüsen-Verankerungsproteins Ht31 durch einen Aminosäureaustausch an Position 502 von Serin nach Prolin mutiert ist (Lester *et al.*, 1997), war nicht mehr in der Lage, einer Promotoraktivierung durch das E1A_{12S}-Protein entgegenzuwirken (Abb. 24B). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde

geschlossen, daß eine funktionelle Interaktion des E1A_{12S}-Proteins mit dem cytoplasmatisch-lokalisierten PKA-Holoenzym im Aktivierungsprozeß des E2_{Ad12}-Promotors eine entscheidende Rolle spielt.

4.14 Die regulatorischen Untereinheiten RI α und RII α des PKA-Holoenzym interagieren mit dem E1A_{12S}-Protein *in vitro*

Eine Möglichkeit, wie das E1A_{12S}-Protein den E2_{Ad12}-Promotor durch eine Bindung an das PKA-Holoenzym aktivieren könnte, besteht in einer Interaktion mit den regulatorischen und/oder katalytischen Untereinheiten der PKA. Nach dieser Hypothese würde es im Zuge der Promotoraktivierung zu einer Dissoziation des PKA-Holoenzym durch das E1A_{12S}-Protein kommen, gefolgt von einer Translokation der C-Untereinheit in den Kern und einer anschließenden Phosphorylierung und Aktivierung der Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1 und/oder den Koaktivatoren p300/CBP (s. Kap. 1.5).

Wie die Ergebnisse der transienten Expressionsanalysen mit den R-Bindepeptidfragmenten Ht31 und AKAP149 zeigten, inhibieren beide Peptide die E1A_{12S}-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors. Da beide Peptide das R-Bindemotiv dieser AKAPs umspannen, wurde vermutet, daß das E1A_{12S}-Protein mit den R-Untereinheiten des PKA-Holoenzym interagieren könnte.

Zu Klärung dieser Fragestellung wurde untersucht, ob die regulatorischen Untereinheiten mit dem E1A_{12S}-Protein *in vitro* interagieren. Hierzu wurden Protein-Protein-Interaktionsanalysen mit GST-E1A_{12S}-Fusionsproteinen und ³⁵S-markierten, *in vitro* transkribierten/translatierten R-Untereinheiten durchgeführt. Für alle nachfolgenden Untersuchungen wurden die regulatorischen α -Untereinheiten des PKA-Holoenzym benutzt, da sie, im Gegensatz zu den regulatorischen β -Untereinheiten, in allen Zellen und Geweben exprimiert werden (Taskén *et al.*, 1997).

Wie aus den Abbildungen 25A und 25B ersichtlich, bindet sowohl die RI α - als auch die RII α -Untereinheit an das GST-E1A_{12S}-Fusionsprotein (Spur 3). Die Deletion der Aminosäuren 1-79 (GST- Δ 1-79/E1A_{12S}) sowie der CR1-Domäne (GST- Δ CR1/E1A_{12S}) des E1A_{12S}-Proteins bewirkten einen Verlust der Interaktion mit der RI α - und RII α -Untereinheit (Abb. 25A und 25B; Spur 5 und 6). Weiterhin führte die Deletion der N-terminalen Domäne (GST- Δ N/E1A_{12S}) zu einem deutlichen Verlust des Bindungspotentials des E1A_{12S}-Proteins an die regulatorischen Untereinheiten (Abb. 25A und 25B, Spur 4). Die GST-Proteindomäne zeigte keine Affinität zu den regulatorischen Untereinheiten (Abb. 25A und 25B, Spur 2).

Als nächstes wurde untersucht, ob die R-Untereinheiten mit dem E1A_{12S}-Protein direkt interagieren. Damit sollte ausgeschlossen werden, daß Faktoren des für die *in vitro* Transkription/Translation benutzten Reticulolysats eine Interaktion zwischen den R-Untereinheiten und dem E1A_{12S}-Protein indirekt vermitteln. Zu diesem Zweck wurden GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen mit bakteriell exprimierten und aufgereinigten RI α - oder RII α -Untereinheiten (der GST-Anteil dieser Proteine wurde durch proteolytischen Thrombin-

verdau abgespalten) und einem GST-E1A_{12S}-Fusionsprotein durchgeführt¹. Interagierende Proteine wurden mittels Western-Blot-Analysen mit einem anti-RI α - und einem anti-RII α -Antikörper detektiert.

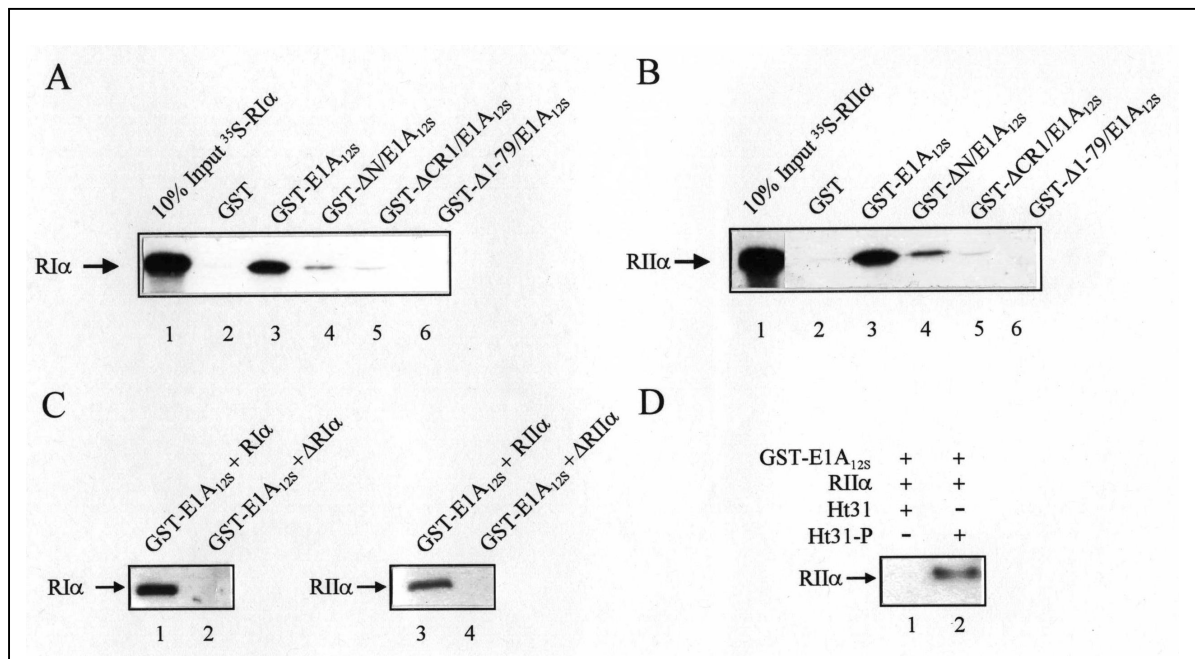


Abb. 25. Die RI α - und RII α -Untereinheit interagieren mit dem E1A_{12S}-Protein *in vitro*. Für die GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen wurde *in vitro* translatiertes, ³⁵S-markiertes RI α (A) oder *in vitro* translatiertes, ³⁵S-markiertes RII α (B) mit der GST-Proteindomäne (Spur 2) oder verschiedenen GST-E1A_{12S}-Fusionsproteinen wie angegeben (Spuren 3 bis 6) inkubiert. Interagierende Proteine wurden eluiert, auf 10%-SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und durch Fluorographie detektiert. Spur 1 repräsentiert 10% des Inputs von ³⁵S-RI α (A) oder ³⁵S-RII α (B). C. Für direkte GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen wurde bakteriell exprimiertes und aufgereinigtes RI α (Spur 1), Δ RI α (deletiert sind As 1-45; Spur 2), RII α (Spur 3) und Δ RII α (deletiert sind As 1-57; Spur 4) mit äquimolaren Mengen eines GST-E1A_{12S}-Fusionsproteins inkubiert. Interagierende Proteine wurden eluiert, auf einem 10%-SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot mit einem anti-RI α - oder anti-RII α -Antikörper analysiert. D. Für direkte GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen wurde bakteriell exprimiertes und aufgereinigtes RII α mit einem GST-E1A_{12S}-Fusionsprotein in Anwesenheit von 100 nM des PKA-Verankerungsinhibitors Ht31 (Spur 1) oder des Kontrollpeptids Ht31-P (Spur 2) inkubiert. Interagierende Proteine wurden eluiert, auf einem 10%-SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot mit einem anti-RII α -Antikörper analysiert.

Diese Experimente zeigten, daß das adenovirale Protein direkt mit den R-Untereinheiten der PKA interagiert (Abb. 25C, Spur 1 und 3). Die Deletion des AKAP-Bindemotivs der RI α - (As 1-45, Leon *et al.*, 1997) oder der RII α -Untereinheit (As 1-57, Hausken *et al.*, 1996; Newlon *et al.*, 1999) führte zu einem Verlust der Interaktion mit dem adenoviralen Protein (Abb. 25C, Spuren 2 und 4). Erwartungsgemäß konnte die Interaktion zwischen dem E1A_{12S}-Protein und der RII α -Untereinheit durch das Ht31-Peptid, welches das RII-Bindemotiv des humanen Schilddrüsen-Verankerungsproteins umspannt, verhindert werden (Abb. 25D, Spur 2). Dagegen wurde die Bindung des E1A_{12S}-Proteins an die RII α -Untereinheit durch die Peptidmutante Ht31-P nicht verhindert (Abb. 25D, Spur 1). Diese

¹ in Kooperation mit Catherine R. Carlson und Kjetil Taskén, Institute of Medical Biochemistry, University of Oslo, Oslo, Norwegen, durchgeführt.

Ergebnisse deuten an, daß Ht31 und das E1A_{12S}-Protein an gleiche oder überschneidende Bindemotive in der RII α -Untereinheit binden. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß Ht31 mit dem adenoviralen Protein interagiert und hierdurch eine Bindung an die RII α -Untereinheit verhindert.

Zusammenfassend belegen die Untersuchungen, daß das E1A_{12S}-Protein direkt an die RI α - und die RII α -Untereinheit *in vitro* bindet und das für eine Interaktion die N-terminale Domäne und die CR1-Domäne im adenoviralen Protein entscheidend sind. Als Interaktionsdomäne des E1A_{12S}-Proteins in den R-Untereinheiten wurde der N-terminale AKAP-Bindebereich identifiziert.

Ein Vergleich der transienten Expressionsanalysen (Abb. 24) mit den Protein-Protein-Interaktionsanalysen (Abb. 25) belegt, daß eine Bindung des E1A_{12S}-Proteins an die R-Untereinheiten mit der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors korreliert. So führt ein Verlust der Bindung des adenoviralen Proteins an die RII α -Untereinheit in Anwesenheit von Ht-31 *in vitro* zu einer Inhibition der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein in Anwesenheit von Ht-31 *in vivo*. Dagegen zeigt die Mutante Ht31-P keine Beeinflussung der Interaktion des E1A_{12S}-Proteins mit der RII α -Untereinheit *in vitro* und keine Inhibition der E1A_{12S}-induzierten Expression des E2_{Ad12}-Promotors *in vivo*.

Um zu überprüfen, ob das E1A_{12S}-Protein neben den regulatorischen α -Untereinheiten an die regulatorischen β -Untereinheiten und die katalytischen Untereinheiten bindet, wurden GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen durchgeführt. In diesen *in vitro*-Interaktionsstudien mit den β -Untereinheiten war nur eine schwache Bindung des E1A_{12S}-Proteins an die RII β -Untereinheit nachweisbar. Eine Interaktion des E1A_{12S}-Proteins mit der RI β -Untereinheit war in diesen Experimenten nicht detektierbar (Daten nicht gezeigt). Weiterhin war in den *in vitro*-Interaktionsstudien keine Interaktion des E1A_{12S}-Proteins mit der C α - oder C β -Untereinheit nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

4.15 Die regulatorischen Untereinheiten RI α und RII α des PKA-Holoenzym interagieren mit dem E1A_{12S}-Protein *in vivo*

Die bisherigen Protein-Protein-Interaktionsanalysen belegen, daß das E1A_{12S}-Protein *in vitro* an die RI α - und RII α -Untereinheit bindet. Um erste Hinweise einer Interaktion zwischen dem adenoviralen Protein und den R-Untereinheiten *in vivo* zu bekommen, wurden Protein-Protein-Bindungsstudien im Hefesystem durchgeführt. Hier sollten sowohl in den R-Untereinheiten als auch in dem E1A_{12S}-Protein Interaktionsmotive identifiziert werden, die für eine Bindung notwendig sind.

Für die *in vivo*-Interaktionsstudien wurde das in unserer Arbeitsgruppe etablierte Hefe-SOS-,Two-Hybrid"-System (Aaronheim *et al.*, 1997) angewandt, das bereits erfolgreich für Interaktionsanalysen des E1A_{12S}-Proteins mit dem Koaktivator p300 eingesetzt wurde (Lipinski *et al.*, 1999; s. Kap. 3.6.8). In dem Hefe-SOS-,Two-Hybrid"-System werden

Protein-Protein-Interaktionen aufgrund des selektiven Wachstums der Hefen bei 36 °C identifiziert. Zu diesem Zweck wurden die cDNAs für die RI α - und die RII α -Untereinheit in den Hefe-Expressionsvektor pYes2-MYR kloniert, der die RI α - und die RII α -Untereinheit mit einem N-terminalen Myristylierungssignal exprimiert (MYR-RI α bzw. MYR-RII α). Weiterhin wurden Proteinmutanten der RI α - und RII α -Untereinheiten kloniert, denen die AKAP-Interaktionsdomäne deletiert worden war (MYR- Δ 1-91/RI α bzw. MYR- Δ 1-91/RII α).

Zur Analyse einer *in vivo*-Interaktion wurden unterschiedliche Kombinationen der entsprechenden pYes2-MYR-Fusionsprotein-Expressionsvektoren für die R-Untereinheiten mit pADNS-SOS-Fusionsprotein-Expressionsvektoren für das E1A_{12S}-Protein (SOS-E1A_{12S}; exprimiert das Vollängen-E1A_{12S}-Protein mit einer C-terminalen SOS-Domäne) oder davon abgeleiteter SOS-E1A_{12S}-Proteinmutanten in *cdc25-2*-Hefen kotransformiert (s. Kap. 3.6.8.2). Von den kotransformierten Hefezellen wurden je vier zufällig ausgewählte Hefeklone auf ihr Wachstum bei der selektiven Wachstumstemperatur von 36 °C getestet.

Wie aus Abb. 26A und 26B ersichtlich, konnten Hefen, die das E1A_{12S}-Protein, den E1A-N-Terminus (exprimiert werden die As 1-29 der Ad12 E1A-Proteine als SOS-Fusionsprotein; SOS-N) oder den E1A-N-Terminus und die CR1-Domäne (exprimiert werden die As 1-79 der Ad12 E1A-Proteine als SOS-Fusionsprotein; SOS-1-79) sowie die RI α - oder die RII α -Untereinheit koexprimierten, bei der nicht-permissiven Temperatur von 36 °C wachsen.

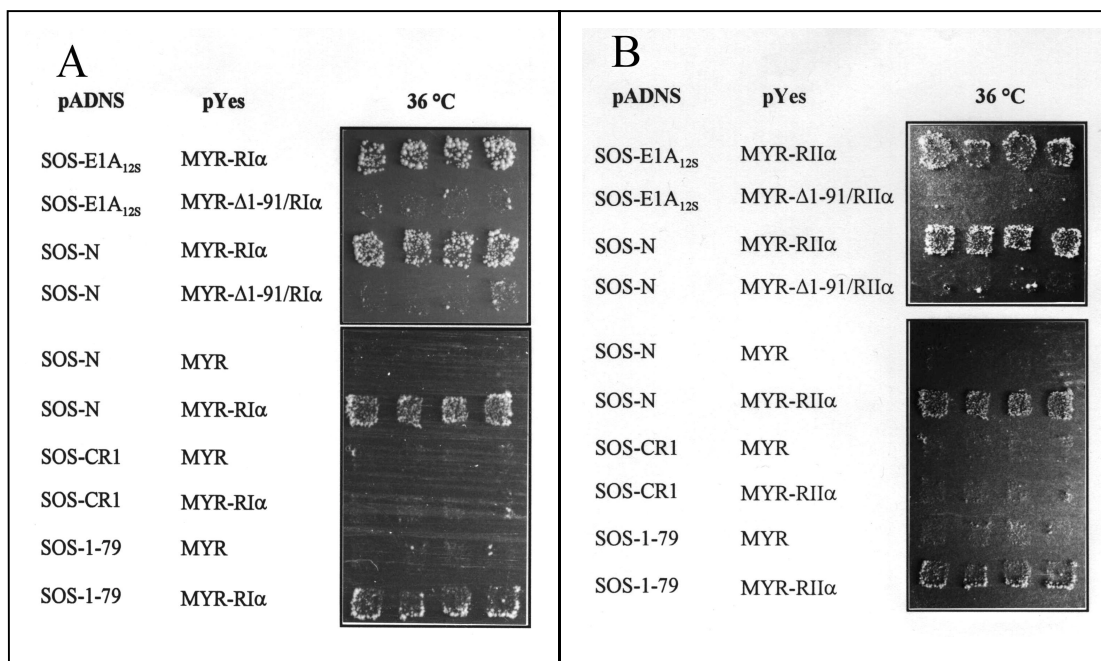


Abb. 26. Das E1A_{12S}-Protein interagiert unter Beteiligung des N-Terminus mit dem AKAP-Bindebereich der RI α - und RII α -Untereinheit im Hefe-SOS-„Two-Hybrid“-System. *Cdc25-2*-Hefezellen wurden mit pADNS-SOS-Expressionsplasmiden für verschiedene SOS-E1A_{12S}-Fusionsproteine und pYes2-MYR-Expressionsplasmiden für MYR-RI α (A), MYR-RII α (B) oder dem pYes2-MYR-Leervektor (MYR) wie angegeben kotransformiert. Die Hefezellen wurden auf YNB^{-Ura/-Leu}-Glucose-Selektionsplatten ausgestrichen und bei der nicht-selektiven Temperatur von 25 °C für 3-5 Tage inkubiert. Danach wurden vier Klone einer Kotransformation gepickt, auf eine YNB^{-Ura/-Leu}-Glucose-Selektionsplatte ausgestrichen und für 3 Tage bei 25 °C wachsen gelassen. Anschließend erfolgte eine Replika-Plattierung auf YNB^{-Ura/-Leu}(+)-Galaktose-Platten und eine weitere Inkubation bei der selektiven Wachstumstemperatur von 36 °C.

Jedoch zeigten die Hefen, die das SOS-1-79-Protein koexprimierten, ein verringertes Wachstum bei der selektiven Temperatur von 36 °C. Die Ursachen für dieses reduzierte Hefewachstum sind bisher unklar. Es wird jedoch oft bei Interaktionsanalysen mit dem SOS-1-79-Protein beobachtet (Lipinski *et al.*, 1999). Wenn die Hefen die CR1-Domäne (exprimiert werden die As 39-79 der Ad12 E1A-Proteine als SOS-Fusionsprotein; SOS-CR1) und die R-Untereinheiten koexprimierten, konnte kein selektives Wachstum bei 36 °C detektiert werden (Abb. 26 A und 26B).

Weiterhin war kein Wachstum unter selektiven Bedingungen zu verzeichnen, wenn die Hefen entweder die RI α - oder die RII α -Deletionsmutante (MYR- Δ 1-91/RI α bzw. MYR- Δ 1-91/RII α) mit dem E1A_{12S}-Protein oder dem E1A-N-Terminus koexprimierten (Abb. 26A und 26B). Als Kontrollen wurden SOS-N, SOS-CR1 und SOS-1-79 mit dem pYes2-MYR-Leervektor (MYR) kotransformiert. Erwartungsgemäß waren die adenoviralen Domänen in Abwesenheit der RI α - oder RII α -Untereinheit nicht in der Lage, ein Hefewachstum unter selektiven Bedingungen zu induzieren (Abb. 26A und 26B). Diese Ergebnisse belegen, daß das E1A_{12S}-Protein mit der RI α - und der RII α -Untereinheit unter *in vivo*-ähnlichen Bedingungen in Hefezellen interagiert. Weiterhin wurde in Übereinstimmung mit den GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen bestätigt, daß eine Interaktion des E1A_{12S}-Proteins unter Beteiligung des N-Terminus über den AKAP-Bindebereich der RI α - und der RII α -Untereinheit erfolgt.

Um zu untersuchen, ob das E1A_{12S}-Protein mit der RI α - und/oder der RII α -Untereinheit in Säugerzellen interagiert, wurden Immunpräzipitationen von transient transfizierten COS7-Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit einem Expressionsvektor für ein myc-Epitop gekoppeltes E1A_{12S}-Protein transfiziert. Gebildete Immunkomplexe wurden mit einem anti-RI α - oder einem anti-RII α -Antikörper präzipitiert und nachfolgend im Western-Blot mit einem anti-Ad12 E1A-Antiserum analysiert. Wie in Abb. 27A dargestellt, führten die Immunpräzipitationen mit einem anti-RII α - oder einem anti-RI α -Antikörper zu einer Kopräzipitation des adenoviralen Proteins (Spur 3 und 4). Kein E1A_{12S}-spezifisches Signal war in den Immunkomplexen aus Kontroll-transfizierten Zellen nachzuweisen (Abb. 27A, Spur 1). Weiterhin konnte das E1A_{12S}-Protein mit einem gegen das myc-Epitop gerichteten Antikörper effizient präzipitiert werden (Abb. 27A, Spur 2). Western-Blot-Analysen der für die Immunpräzipitationen eingesetzten Gesamtzellextrakte bestätigten die Expression des E1A_{12S}-Proteins in den transfizierten COS7-Zellen (Abb. 27B, Spuren 2-4).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse deutlich, daß das E1A_{12S}-Protein mit der RI α - und der RII α -Untereinheit des PKA-Holoenzym *in vivo* interagiert.

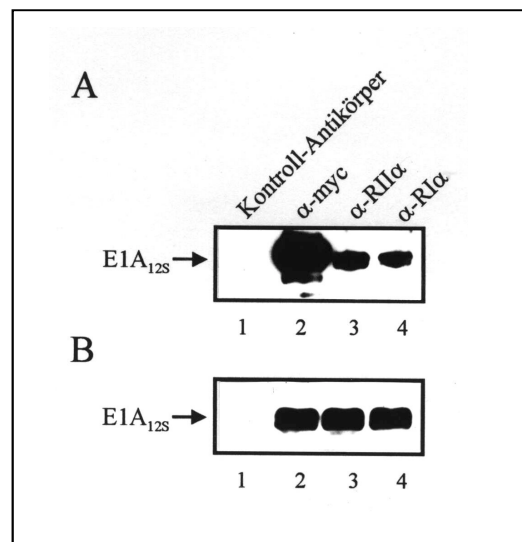


Abb. 27. Die RI α - und die RII α -Untereinheit interagieren mit dem E1A $_{12S}$ -Protein *in vivo*. **A.** COS7-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für ein myc-gekoppeltes E1A $_{12S}$ -Wildtyp-Protein (Spuren 2-4) oder mit dem entsprechenden Leervektor (Spur 1) transfiziert. Die Zellen wurden 48 h später lysiert und die Gesamtzellextrakte entweder mit einem Kontroll-Antiserum (normales Kaninchen-IgG, Spur 1), einem anti-myc- (Spur 2), einem anti-RII α - (Spur 3) oder einem anti-RI α -Antikörper (Spur 4) inkubiert. Gebildete Immunkomplexe wurden auf einem 12%-SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot mit einem anti-Ad12 E1A-Antiserum analysiert. Die Position des E1A $_{12S}$ -Proteins ist durch einen Pfeil links angegeben. **B.** Die Expression des E1A $_{12S}$ -Proteins in den transfizierten COS7-Zellen wurde vor der Immunpräzipitation mittels Western-Blot mit dem anti-Ad12 E1A-Antiserum analysiert. Die Position des E1A $_{12S}$ -Proteins ist durch einen Pfeil links angegeben.

4.16 Das E1A $_{12S}$ -Protein transloziert die RII α -Untereinheit in den Zellkern

Die bisherigen Ergebnisse des SOS-„Two-Hybrid“-Systems und der Immunpräzipitationen beweisen, daß das E1A $_{12S}$ -Protein mit der RI α - und der RII α -Untereinheit des PKA-Holoenzym *in vivo* interagiert. Nachfolgend wurde analysiert, welche funktionelle Konsequenz die Interaktion des E1A $_{12S}$ -Proteins mit der RI α - und/oder der RII α -Untereinheit des PKA-Holoenzym im Aktivierungsprozeß des viralen E2 $_{Ad12}$ -Promotors hat.

Um zu untersuchen, ob die Interaktion des E1A $_{12S}$ -Proteins mit den R-Untereinheiten einen Einfluß auf die zelluläre Lokalisation des PKA-Holoenzym ausübt, wurden Immunfluoreszenz-Untersuchungen² (s. Kap. 3.6.7) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden COS7-Zellen mit Expressionsvektoren für ein FLAG-Epitop gekoppeltes (E1A $_{12S}$ -FLAG) oder ein myc-Epitop gekoppeltes E1A $_{12S}$ -Wildtyp-Protein (E1A $_{12S}$ -myc) und die davon abgeleitete Deletionsmutante Δ 1-79/E1A $_{12S}$ -myc (deletiert sind der N-Terminus und die CR1-Domäne) transfiziert. Die E1A $_{12S}$ -Proteinmutante Δ 1-79/E1A $_{12S}$ wurde benutzt, da sie in den *in vitro*-Interaktionsanalysen nicht mehr in der Lage war, an die R-Untereinheiten zu binden (s. a. Abb. 25A und 25B) und den E2 $_{Ad12}$ -Promotor zu aktivieren (Abb. 7B). Die transfizierten Zellen wurden fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen die RI α -Untereinheit, die RII α -Untereinheit und gegen das myc- bzw. FLAG-Epitop der E1A $_{12S}$ -Fusionsproteine inkubiert

² in Kooperation mit Philippe Collas und Kjetil Taskén, Institute of Medical Biochemistry, University of Oslo, Oslo, Norwegen, durchgeführt.

und die zelluläre Verteilung dieser Proteine in Immunfluoreszenz-Untersuchungen analysiert. Die Expression des E1A_{12S}-FLAG-Fusionsproteins führte zu einer drastischen Umverteilung der RII α -Untereinheit aus dem Cytoplasma in den Zellkern, wobei es hier zu einer Kolo­kalisierung der RII α -Untereinheit und dem E1A_{12S}-Protein kam (Abb. 28A, obere Reihe, rechtes Bild, gelb gefärbt). Interessanterweise hatte die Expression des E1A_{12S}-FLAG-Fusionsproteins keinen Einfluß auf die Lokalisation der RI α -Untereinheit (Abb. 28A, untere Reihe, rechtes Bild).

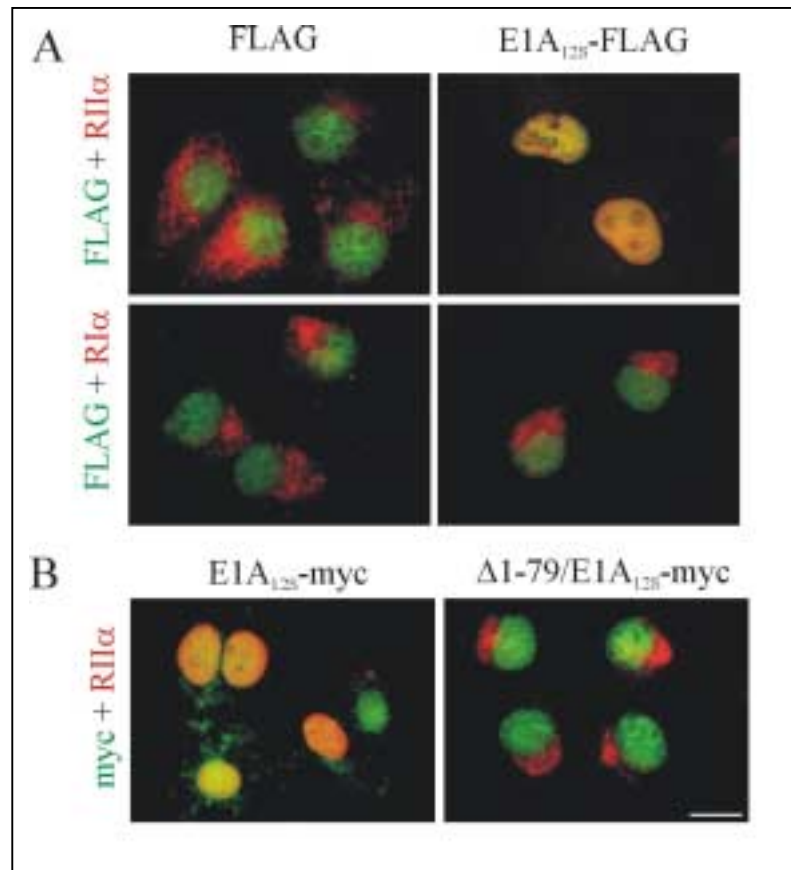


Abb. 28. Umverteilung der cytoplasmatisch-lokalisier­ten RII α -Untereinheit in den Zellkern transient E1A_{12S}-Protein exprimierender COS7-Zellen. **A.** COS7-Zellen wurden mit einem Kontrollvektor für das FLAG-Epitop (linke Spalte) oder einem Expressionsvektor für das E1A_{12S}-FLAG-Fusionsprotein (rechte Spalte) transfiziert. Die Zellen wurden 48 h später fixiert und die intrazelluläre Verteilung des FLAG-Epitops (grün), der RII α - (rot, obere Reihe) oder der RI α -Untereinheit (rot, untere Reihe) wurde mittels Immunfluoreszenz analysiert. **B.** COS7-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für ein E1A_{12S}-myc-Wildtyp-Protein (linkes Bild) oder die davon abgeleitete Deletionsmutante Δ 1-79/E1A_{12S} transfiziert. Die Zellen wurden 48 h später fixiert und die intrazelluläre Verteilung des myc-Epitops (grün) und der RII α -Untereinheit (rot) mittels Immunfluoreszenz-Untersuchungen bestimmt. Die Strichlänge entspricht einer Länge von 10 μ m.

Die cytoplasmatische Lokalisation der RII α -Untereinheit wurde durch die Expression der E1A_{12S}-Proteindeletionsmutante Δ 1-79/E1A_{12S}-myc nicht beeinflusst (Abb. 28B, rechtes Bild). Das E1A_{12S}-myc-Wildtyp-Protein hingegen bewirkte erwartungsgemäß eine Translokation der RII α -Untereinheit in den Zellkern (Abb. 28B, linkes Bild). Die alleinige Expression des FLAG-Epitops konnte im Zellkern detektiert werden (Abb. 28A, linke Spalte, grün gefärbt) und hatte keinen Einfluß auf die Lokalisation der RII α - oder der

RI α -Untereinheit (Abb. 28A, linke Spalte, rot gefärbt), die in Übereinstimmung mit publizierten Daten ausschließlich im Cytoplasma nachzuweisen sind (Keryer *et al.*, 1999).

Um die in den Immunfluoreszenz-Untersuchungen gezeigte Translokation der RII α -Untereinheit durch das adenovirale Protein mit einer weiteren, unabhängigen Methode zu bestätigen, wurden Western-Blot-Analysen vom Cytoplasma- und Kernextrakt Kontroll- oder E1A_{12S}-transfizierter COS7-Zellen durchgeführt.

Die Inkubation mit einem anti-RII α -Antikörper zeigte, daß die Expression des E1A_{12S}-Proteins zu einer 8-fachen Anreicherung der RII α -Untereinheit im Zellkern führte (Abb. 29A; vgl. Spur 1 mit Spur 2; die densitometrische Auswertung erfolgte mit dem LKB UltroScan XL Laser Densitometer). Gleichzeitig kam es zu einer Verringerung der RII α -Konzentration im Cytoplasma (Abb. 29B; vgl. Spur 1 mit Spur 2).

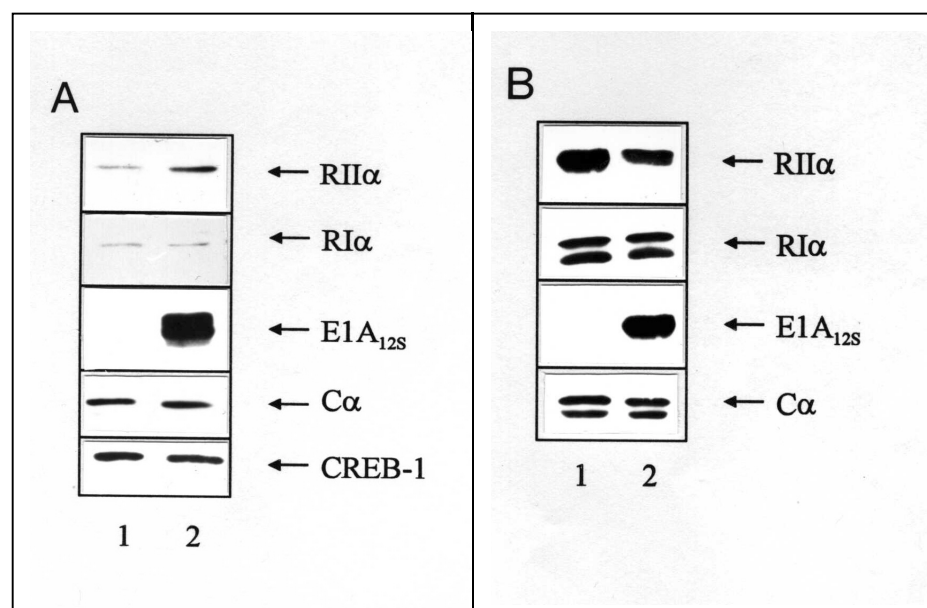


Abb. 29. Die Expression des E1A_{12S}-Proteins führt zu einer Translokation der RII α -Untereinheit in den Zellkern. COS7-Zellen wurden mit einem Expressionsvektor für ein FLAG-gekoppeltes E1A_{12S}-Wildtyp-Protein (Spur 2) oder mit dem entsprechenden Kontrollvektor (Spur 1) transfiziert. Von den Zellen wurden 48 h später Kern- (A) und Cytoplasmaextrakte (B) präpariert. Der Kern- und Cytoplasmaextrakt wurde auf einem 12%-SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot mit Antikörpern gegen RII α , RI α , E1A_{12S} (anti-Ad12 E1A-Antiserum), C α und CREB-1 analysiert. Die Positionen der Proteine sind durch Pfeile rechts angegeben.

In Übereinstimmung mit den Immunfluoreszenz-Untersuchungen war die zelluläre Lokalisation der RI α -Untereinheit nicht verändert. Hier konnten mit einem anti-RI α -Antikörper nur marginale Spuren der RI α -Untereinheit im Kernextrakt von Kontroll- oder E1A_{12S}-Protein exprimierenden Zellen nachgewiesen werden (Abb. 29A und 29B, vgl. Spur 1 mit Spur 2). Interessanterweise kam es in Anwesenheit des adenoviralen Proteins zu keiner nachweisbaren Anreicherung der katalytischen Untereinheit C α im Zellkern (Abb. 29A und 29B; vgl. Spur 1 mit Spur 2). Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit den Daten der Immunfluoreszenz-Untersuchungen, mit Hilfe derer keine Beeinflussung der zellulären Lokalisation der C α -Untereinheit in Gegenwart des adenoviralen Proteins detektiert wurde

(Daten nicht gezeigt). Die zelluläre Lokalisation des E1A_{12S}-Proteins im Zellkern wurde bestätigt (Abb. 29A; Spur 2). Weiterhin war das adenovirale Protein auch im Cytoplasma nachzuweisen (Abb. 29B). Die Inkubation mit einem anti-CREB-1-Antikörper bestätigte zudem, daß vergleichbare Kernextraktmengen aus Kontroll- und E1A_{12S}-transfizierten Zellen auf die Membran transferiert wurden (Abb. 29A, vgl. Spur 1 mit Spur 2).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Expression des E1A_{12S}-Proteins zu einer Translokation der cytoplasmatisch-lokalisierten RII α -Untereinheit in den Zellkern führt. Diese Translokation ist spezifisch, da die zelluläre Lokalisation der RI α -Untereinheit in Anwesenheit des adenoviralen Proteins nicht verändert ist. Darüber hinaus ist die Konzentration der C-Untereinheit im Zellkern durch das E1A_{12S}-Protein wahrscheinlich ebenfalls unbeeinflusst. Somit sprechen diese Daten gegen einen Aktivierungsmechanismus, bei dem eine Interaktion des E1A_{12S}-Proteins mit dem PKA-Holoenzym eine erhöhte Freisetzung der C-Untereinheit im Cytoplasma, gefolgt von einer Translokation der C-Untereinheit in den Zellkern, bewirkt. Vielmehr lassen sie die Vermutung zu, daß nur die RII α -Untereinheit, wahrscheinlich ohne gebundene katalytische Untereinheit, in den Zellkern transloziert (s. Kap. 5.2).

4.17 Die Koexpression der RII α -Untereinheit und des E1A_{12S}-Proteins führt zu einer starken Transaktivierung des E2_{Ad12}-Promotors

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Untersuchungen und der Western-Blot-Analysen beweisen, daß das E1A_{12S}-Protein die RII α -Untereinheit in den Zellkern transloziert. Diese Umverteilung der RII α -Untereinheit aus dem Cytoplasma in den Zellkern läßt die Vermutung zu, daß die RII α -Untereinheit möglicherweise eine bisher unbekannte transkriptionsregulierende Funktion CRE-abhängiger Promotoren besitzen könnte. Vorstellbar wäre, daß die translozierte RII α -Untereinheit eine wichtige Kofaktorfunktion im Prozeß der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein besitzt.

Um die funktionelle Bedeutung der Translokation der RII α -Untereinheit vom Cytoplasma in den Zellkern durch das adenovirale Protein zu untersuchen, wurden transiente Expressionsanalysen durchgeführt. Hierzu wurde das Reporterkonstrukt E2_{Ad12}-CAT mit Expressionsvektoren für die RII α -Untereinheit und/oder dem E1A_{12S}-Protein kotransfiziert (Abb. 30). Erwartungsgemäß aktivierte das E1A_{12S}-Protein das Reporterkonstrukt E2_{Ad12}-CAT (8-fach; Abb. 30). Die alleinige Expression der RII α -Untereinheit ergab lediglich eine leichte, aber reproduzierbare, Aktivierung des Reportergens (2-3-fach; Abb. 30). Erstaunlicherweise führte die Koexpression des E1A_{12S}-Proteins mit der RII α -Untereinheit zu einer 18-fachen Aktivierung der CAT-Genexpression des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT.

Diese Ergebnisse deuten an, daß die translozierte RII α -Untereinheit eine wichtige transkriptionsregulierende Kofaktorfunktion in dem Aktivierungsprozeß des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein ausübt.

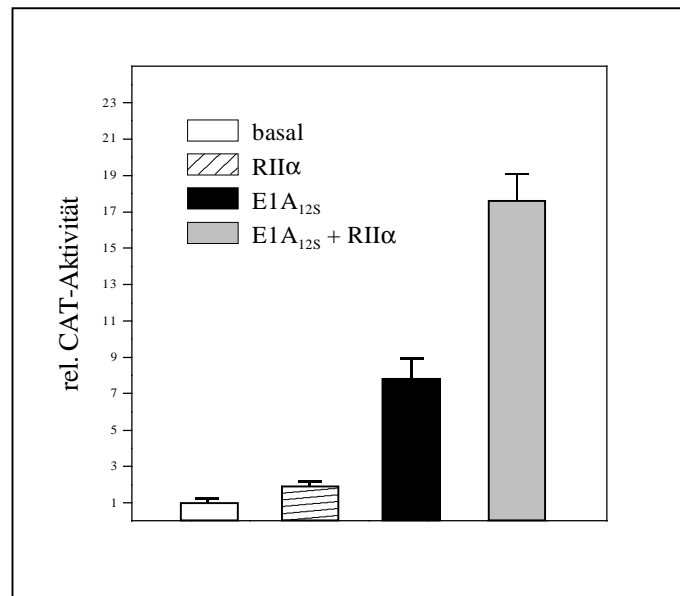


Abb. 30. Die Koexpression der RII α -Untereinheit und des E1A_{12S}-Proteins führt zu einer starken Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors. KB-Zellen wurden mit 1 μ g des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT sowie 0,3 μ g pRc/RSV-E1A_{12S}- und 1,5 μ g PCR3.1-RII α -Expressionsvektor kotransfiziert. Die Menge an transfizierter DNA wurde durch Auffüllen mit den Leervektoren pRc/RSV und PCR3.1 konstant gehalten. Die CAT-Enzymaktivität wurde 24 h später bestimmt. Die relativen Aktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Transfektionsexperimenten. Die Promotoraktivität des Reporterkonstrukts E2_{Ad12}-CAT in Anwesenheit der Leervektoren pRc/RSV und PCR3.1 wurde als 1 normiert.

Somit ist ein völlig neuartiger Mechanismus der E1A_{12S}-vermittelten Aktivierung CRE/CREB-abhängiger Zielgene durch die Interaktion mit dem cytoplasmatisch-lokalisierten PKA-Holoenzym, gefolgt von der Translokation der RII α -Untereinheit in den Zellkern, anzunehmen (s. Kap. 5.2).

5. Diskussion

Die Regulation der E2-Region durch den E2-Promotor ist im lytischen Entwicklungszyklus der Adenoviren von entscheidender Bedeutung. Die Proteine dieser Region werden für die Replikation des Virusgenoms benötigt und sind somit für die erfolgreiche Vermehrung von Adenoviren essentiell (Shenk, 1996 und Referenzen hierin). Wie meine Untersuchungen belegen, wird der E2_{Ad12}-Promotor des Adenovirus-Serotyps 12 durch das Ad12 E1A_{12S}-Protein über ein CRE-Element (als E2-CRE bezeichnet) transaktiviert.

Durch die CRE-Elemente in den adenoviralen Promotoren besteht für Adenoviren die Möglichkeit, den ubiquitären cAMP/PKA-abhängigen Signaltransduktionsweg für die Aktivierung der viralen Promotoren und somit die Expression der adenoviralen Gene in unterschiedlichen Zellsystemen zu gewährleisten. Jedoch ist die intrazelluläre Konzentration von cAMP in den Zellen niedrig und wird nach den bisher publizierten Daten durch die adenoviralen E1A-Proteine nicht verändert (Florin-Christensen *et al.*, 1993). Für die Expression cAMP-abhängiger Zielgene ist aber die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration und damit einhergehend die Aktivierung des PKA-Holoenzym der entscheidende Schritt in der Expression dieser Zielgene (s. Kap. 1.5). Es stellte sich daher die Frage, wie Adenoviren durch die E1A-Proteine die Fähigkeit besitzen, den für die Aktivierung der adenoviralen Promotoren notwendigen zellulären cAMP/PKA-abhängigen Signaltransduktionsweg, anscheinend unabhängig von einer cAMP-Neusynthese, zu aktivieren. In den Untersuchungen zur Klärung der Mechanismen der E1A_{12S}-vermittelten Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch die Modulation des cAMP/PKA-abhängigen Signaltransduktionswegs habe ich gezeigt:

1. daß es im Zuge der cAMP-unabhängigen Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors zur Bildung eines ternären Komplexes bestehend aus den cAMP/PKA-abhängigen Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1, den Koaktivatoren p300/CBP und dem E1A_{12S}-Protein kommt,
2. daß die von den Koaktivatoren p300/CBP induzierten Acetylierungen im Prozeß der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein notwendig sind,
3. daß die Interaktion des E1A_{12S}-Proteins mit der regulatorischen RII α -Untereinheit des PKA-Holoenzym im Cytoplasma zu einer Translokation dieser Untereinheit in den Zellkern führt. Die cAMP-unabhängige Aktivierung des PKA-Holoenzym durch das E1A_{12S}-Protein hat eine starke Aktivierung des viralen E2_{Ad12}-Promotors zur Folge.

Wie meine Untersuchungen zeigen, greifen die cytoplasmatischen und nukleären Funktionen des E1A_{12S}-Proteins im Prozeß der Transkriptionsaktivierung des E2_{Ad12}-Promotors effizient ineinander. In den folgenden Abschnitten werden die durch das E1A_{12S}-Protein vermittelten

Funktionen im Zellkern (s. Kap. 5.1) und im Cytoplasma (s. Kap. 5.2) im Einzelnen erörtert und dann abschließend im Modell (s. Kap. 5.3) zusammengeführt.

5.1 Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch den E2-CRE-gebundenen Komplex bestehend aus CREB-1/ATF-1, p300/CBP und dem E1A_{12S}-Protein

Die adenoviralen E1A-Proteine besitzen keine sequenzspezifische DNA-Bindungseigenschaft, sondern vermitteln ihre genregulatorischen Funktionen durch Protein-Protein-Wechselwirkungen mit zellulären Faktoren. Diese Faktoren können, wie in Kap. 1.3 beschrieben, DNA-sequenzspezifisch-bindende Transkriptionsfaktoren, Repressoren zellulärer Transkriptionsfaktoren, Faktoren des basalen Transkriptionsapparates oder Koaktivatoren sein.

Die durchgeführten transienten Expressionsstudien zu dem Aktivierungsmechanismus des E2_{Ad12}-Promotors zeigten, daß für die E1A_{12S}-induzierte Transkription des E2_{Ad12}-Promotors das E2-CRE von entscheidender Bedeutung ist (s. Kap. 4.1). Das E2-CRE-Promotorelement wird von den cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktoren CREB-1 und ATF-1 gebunden, die ihrerseits das E1A_{12S}-Protein an den viralen Promotor rekrutieren (s. Kap. 4.3 und 4.7). Die anschließende Interaktion mit den zellulären Koaktivatoren p300/CBP und die daraus resultierende Bildung eines ternären Proteinkomplexes bestehend aus CREB-1/ATF-1, p300/CBP und dem E1A_{12S}-Protein scheint im Prozeß der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors notwendig zu sein (s. Kap. 4.7). Dabei korreliert das Transaktivierungspotential des E1A_{12S}-Proteins eindeutig mit seiner Bindung an die Histonacetyltransferasen p300/CBP *in vivo* (s. Kap. 4.12; Lipinski *et al.*, 1999). Das läßt die Schlußfolgerung zu, daß beide Koaktivatoren eine zentrale Funktion im Prozeß der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein ausüben.

Eine Funktion des E1A_{12S}-Proteins im Aktivierungsprozeß besteht möglicherweise darin, daß das adenovirale Protein durch die Rekrutierung an den E2-CRE-gebundenen CREB-1/ATF-1-Komplex als zusätzliche hochaffine Bindestelle für die Koaktivatoren p300/CBP dient. Hierdurch kann das E1A_{12S}-Protein als Brückenmolekül, unabhängig von der cAMP/PKA-vermittelten Phosphorylierung von CREB-1 und/oder ATF-1, die Bindung von p300/CBP an die E2-CRE-assoziierten, unphosphorylierten Transkriptionsfaktoren stabilisieren oder erst ermöglichen. Nach diesem Modell der Aktivierung des viralen Promotors wäre weder CREB-1 noch ATF-1 an einer direkten p300/CBP-Interaktion beteiligt. Jedoch sprechen die transienten Expressionsanalysen mit den PKA-spezifischen Inhibitoren PKI und H-89 gegen eine solche phosphorylierungsunabhängige Interaktion von CREB-1/ATF-1 im Aktivierungsprozeß durch das adenovirale Protein (s. Kap. 4.4 und 4.13). Da sowohl PKI als auch H-89 als potente Inhibitoren der Phosphotransferase-Aktivität der PKA der E1A_{12S}-induzierten Transkription des E2_{Ad12}-Promotors entgegenwirken, deutet das darauf hin, daß u. a. die Phosphorylierung von CREB-1 und/oder ATF-1 für die Promotor-

aktivierung wichtig ist. Die Annahme wird weiterhin durch transiente Expressionsanalysen mit einer phosphorylierungsdefekten CREB-1-Proteinmutante gestützt, die einen Aminosäureaustausch von Serin nach Alanin in der Phosphoakzeptorbindestelle an der Position 133 besitzt und somit nicht mehr durch die C-Untereinheit der PKA phosphoryliert wird (Gonzalez und Montminy, 1989). Die Expression der CREB-1-Proteinmutante führt zu einem Verlust der Aktivierung des viralen Promotors durch das E1A_{12S}-Protein (Daten nicht gezeigt). Eine ungeklärte und interessante Frage ist, ob das E1A_{12S}-Protein weiterhin mit unphosphoryliertem CREB-1 (oder ATF-1) interagiert und über diese Proteinmutante überhaupt an das E2-CRE rekrutiert werden kann.

Nach den hier präsentierten Ergebnissen sind CREB-1/ATF-1 (im Folgenden als CREB zusammengefaßt, wenn nicht gesondert erwähnt) im Aktivierungsprozeß an einer direkten, phosphorylierungsabhängigen Interaktion mit den zellulären Koaktivatoren p300/CBP beteiligt. Meine Experimente lassen weiterhin den Schluß zu, daß eine Interaktion zwischen dem E1A_{12S}-Protein und p300/CBP für eine effiziente Rekrutierung der Koaktivatoren an den E2_{Ad12}-Promotor nicht ausreicht. Meine Arbeitshypothese geht gegenwärtig davon aus, daß das E1A_{12S}-Protein zu Beginn des Aktivierungsprozesses, möglicherweise durch die Interaktion mit CREB, an den viralen Promotor rekrutiert wird. Die Koaktivatoren p300/CBP können dann ihrerseits mit dem E2-CRE-gebundenen CREB/E1A_{12S}-Komplex assoziieren und durch den gleichzeitigen Kontakt mit beiden Faktoren den ternären Komplex stabilisieren.

Im Gegensatz zu der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors werden andere cAMP/PKA-abhängige Promotoren durch das E1A_{12S}-Protein reprimiert. So wird beispielsweise die cAMP/PKA-abhängige Transkription des Somatostatin-Promotors durch die E1A_{12S}-vermittelte Dissoziation eines CRE-gebundenen Komplexes aus p300/CBP und CREB inhibiert (Arany *et al.*, 1995). Dagegen wird durch die gleichen Faktoren des cAMP/PKA-abhängigen Signalwegs der E2_{Ad12}-Promotor oder der PCNA-Promotor (Fax *et al.*, 2000; Lee und Mathews, 1997) über einen CRE-gebundenen Komplex bestehend aus CREB und p300/CBP durch das E1A_{12S}-Protein aktiviert. Hier stellt sich die interessante Frage, welche molekularen Mechanismen letztendlich eine Aktivierung CRE-abhängiger Promotoren über einen Komplex aus CREB und p300/CBP durch das E1A_{12S}-Protein ermöglichen und warum es nicht, wie bei dem Somatostatin-Promotor, zu einer Dissoziation des CRE-gebundenen Komplexes kommt. Hier scheinen im Aktivierungsprozeß des viralen Promotors, neben der Bindung an den Komplex aus CREB und p300/CBP, weitere Interaktionen des E1A_{12S}-Proteins mit promotorgebundenen Faktoren wie DNA-bindenden oder generellen Transkriptionsfaktoren notwendig zu sein. Solche Interaktionen könnten den CREB/CBP-Komplex auf dem viralen E2-Promotor stabilisieren und eine Dissoziation eines solchen Komplexes durch das E1A_{12S}-Protein, wie für den Somatostatin-Promotor beschrieben, verhindern. Da in unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde, daß das E1A_{12S}-Protein mit der TF_{II}D-Untereinheit TBP und der TF_{II}F-Untereinheit RAP30 wechselwirkt, könnten solche Interaktionen den Komplex auf dem E2_{Ad12}-Promotor stabilisieren (Lipinski *et al.*, 1998).

Weiterhin wurde gezeigt, daß der Koaktivator CBP mit promotor-spezifischen Kofaktoren assoziiert vorliegt, die in der genspezifischen Transkriptionsaktivierung eine wichtige Funktion ausüben (Puigserver *et al.*, 1998). Obwohl die molekulare Basis der Assoziation von CBP mit promotor-spezifischen Kofaktoren bisher unverstanden ist, bieten sie die Grundlage für die Hypothese, daß solche Kofaktoren die Transkription bestimmter CREB/CBP-abhängiger Promotoren wie dem viralen E2_{Ad12}-Promotor oder dem humanen PCNA-Promotor in Anwesenheit des E1A_{12S}-Proteins zulassen (Fax *et al.*, 2000; Lee und Mathews, 1997).

Eine andere Erklärung, wie das E1A_{12S}-Protein die cAMP-abhängige Genexpression ohne Dissoziation eines promotorgebundenen Komplexes aus CREB und p300/CBP aktivieren könnte, wäre, daß das adenovirale Protein mit funktionell verschiedenen Domänen von p300/CBP interagiert. So konnte u. a. in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß das E1A_{12S}-Protein mit der N-terminalen Domäne, der C/H3-Domäne, der glutaminreichen Domäne im C-Terminus sowie der KIX-Domäne von p300/CBP interagiert (Kurokawa *et al.*, 1998; Lipinski *et al.* 1999, Fax *et al.*, 2000). Die Daten lassen die Vermutung zu, daß die Interaktionsdomänen für das E1A_{12S}-Protein in p300/CBP in Abhängigkeit des Promotor-kontexts variieren könnten. Solche alternativen Interaktionen des E1A_{12S}-Proteins mit funktionell verschiedenen Domänen von p300/CBP würden hierdurch eine Aktivierung oder Repression der CRE-abhängigen Genexpression unter Beteiligung der gleichen Faktoren erklären. Hier muß aber postuliert werden, daß die Bindung des E1A_{12S}-Proteins an funktionell unterschiedliche Domänen von p300/CBP durch promotor-spezifische Faktoren bestimmt werden.

Wie meine Ergebnisse zeigen, stellen die Koaktivatoren p300/CBP wichtige Schaltstellen für die Regulation des CRE-abhängigen E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein dar. Durch ihre zahlreichen Interaktionsdomänen und ihre intrinsische HAT-Aktivität greifen diese zellulären Koaktivatoren als entscheidende Faktoren in den Transaktivierungsprozeß von Zielgenen ein (als Übersicht s. Giordano und Avantaggiati, 1999; s. Kap. 1.4). Wie Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Rosenfeld (Korzus *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998) bewiesen, ist die HAT-Aktivität der Koaktivatoren p300/CBP für die Expression CRE-regulierter Promotoren essentiell. Aufgrund der Bedeutung der HAT-Aktivität von p300/CBP für die Regulation CRE-abhängiger Promotoren stellte sich die Frage, ob die HAT-Aktivität der rekrutierten Koaktivatoren im Aktivierungsprozeß des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein ebenfalls einer Funktion zukommt. Das Histonacetylierungen durch Faktoren mit HAT-Funktion im lytischen Entwicklungszyklus von Adenoviren notwendig sind, wird dadurch verdeutlicht, daß die virale DNA nach Infektion einer Zelle in eine nukleosomenartige Struktur verpackt wird (Dery *et al.*, 1985 und Referenzen hierin; Shenk, 1996). Durch die Rekrutierung von Acetyltransferasen wie p300/CBP in der E1A_{12S}-aktivierten Transkription des E2_{Ad12}-Promotors besteht hier eine Möglichkeit, die nukleosomale Repression der Promotorregion durch die Acetylierungen von Histonen aufzuheben. Das solchen Acetylierungsprozessen eine wichtige Funktion in der Aktivität des

viralen Promotors zukommt, konnte durch Chromatin-Immunpräzipitationen bestätigt werden (s. Kap. 4.10). Hier bewies ich einen Zusammenhang zwischen der Promotoraktivität des E2_{Ad12}-Promotors und dem Acetylierungsstatus des mit dem viralen Promotor assoziierten Histons H4. Die transienten Expressionsanalysen mit der Histondeacetylase HDAC-1 und Roscovitine, einem Inhibitor der CyclinE-cdk2-vermittelten Aktivierung der HAT-Funktion von p300/CBP (Ait-Si-Ali *et al.*, 1998), zeigten, daß eine HAT-Aktivität in der E1A_{12S}-aktivierten Transkription eine wichtige Rolle spielt (s. Kap. 4.8). Die Überexpression von p300/CBP hob zudem die HDAC-1-vermittelte Repression des E2_{Ad12}-Promotors auf (s. Kap. 4.9). Außerdem belegen meine Daten, daß das E1A_{12S}-Protein mit einer HAT-Aktivität *in vivo* assoziiert vorliegt, die eindeutig mit der Bindung des adenoviralen Proteins an die zellulären Acetylasen p300/CBP und der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors korreliert (s. Kap. 4.12 und hier als Zusammenfassung Abb. 22).

Interessanterweise scheint dagegen die HAT-Aktivität des p300/CBP-assoziierten Faktors P/CAF, der ebenfalls mit den E1A-Proteinen *in vivo* interagiert (Reid *et al.*, 1998), nicht von Bedeutung für die Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein zu sein. Weiterhin kann die Überexpression von P/CAF in transienten Expressionsanalysen die HDAC-1-vermittelte Repression des viralen Promotors nicht aufheben (Daten nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit meinen Daten belegen Arbeiten von Korzus *et al.* (1998), daß für die Aktivierung cAMP-abhängiger Promotoren die HAT-Aktivität von p300/CBP notwendig ist, wogegen der HAT-Aktivität von P/CAF keine Bedeutung zukommt.

Meine Daten lassen somit die Schlußfolgerung zu, daß die HAT-Aktivität der an den E2_{Ad12}-Promotor rekrutierten Koaktivatoren p300/CBP eine wichtige Rolle im Aktivierungsprozeß des viralen Promotors durch das E1A_{12S}-Protein spielt. Die Frage, die sich hieraus ergab, war, wie das E1A_{12S}-Protein die HAT-Aktivität von p300/CBP im Prozeß der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors moduliert (s. Kap. 4.11). Bezüglich der Modulation der HAT-Aktivität von p300/CBP durch E1A-Proteine sind jedoch widersprüchliche Daten publiziert (s. Kap. 1.4.1.1). So wurde von einigen Arbeitsgruppen gezeigt, daß das E1A_{12S}-Protein die HAT-Aktivität von p300/CBP in biochemischen Analysen inhibiert (Chakravarti *et al.*, 1999; Hamamori *et al.*, 1999), wogegen meine Ergebnisse den Nachweis erbringen, daß das E1A_{12S}-Protein durch die direkte Bindung an die C/H3-Domäne die HAT-Aktivität von CBP erhöht. Dies ist in Übereinstimmung mit publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls keine Inhibierung der HAT-Aktivität von p300/CBP nachwiesen (Ait-Si-Ali *et al.*, 1998; Bannister und Kouzarides, 1996).

Da die C/H3-Domäne nah zur HAT-Domäne liegt (s. Kap. 1.4.1, Abb. 4), wird möglicherweise durch die direkte Bindung des E1A_{12S}-Proteins an die C/H3-Domäne von p300/CBP eine Konformationsänderung verursacht, die zu einer Stimulation der enzymatischen Aktivität führen könnte. Da solche allosterischen Mechanismen die HAT-Aktivität dieser Koaktivatoren beeinflussen, wird durch Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Harel-Bellan bekräftigt, die zeigten, daß eine Phosphorylierung von CBP (und möglicherweise von p300) im C-Terminus (As 1869-2441) durch CyclinE-cdk2-Komplexe eine Erhöhung der HAT-Aktivität des Koaktivators am G1/S-Phase-Übergang bewirkt (Ait-

Si-Ali *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß das E1A_{12S}-Protein den Effekt zellulärer, proliferationsrelevanter Kinasen wie z. B. CyclinE-cdk2 durch die direkte Interaktion mit der C/H3-Domäne von p300/CBP mimikrieren könnte. Die Aktivierung der enzymatischen Acetylasefunktion von p300/CBP durch das adenovirale Protein wäre dann für die Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors entscheidend.

Im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen Aktivierung der HAT-Aktivität und damit einhergehend der Acetylierung von Histonen durch das E1A_{12S}-Protein, zeigten Arbeiten anderer Arbeitsgruppen eine konzentrationsabhängige Inhibition der p300-vermittelten Acetylierung von Histonen durch das E1A_{12S}-Protein *in vitro* (Hamamori *et al.*, 1999, Chakravarti *et al.*, 1999, Perissi *et al.*, 1999). In den von mir durchgeführten Analysen wurde erst bei sehr hohen Konzentrationen des rekombinanten E1A_{12S}-Proteins eine Inhibition der HAT-Aktivität von CBP *in vitro* beobachtet. Eine Erklärung hierfür wäre, daß das E1A_{12S}-Protein bei hohen Konzentrationen anstelle der Histone als Substrat für die enzymatische Aktivität von CBP *in vitro* dient. Diese Annahme wird durch die Daten von Chakravarti und Mitarbeitern (1999) gestützt, die zeigten, daß E1A-Proteine von p300/CBP *in vitro* effizient acetyliert werden.

Eine noch offene Frage ist, ob im Zuge der Promotoraktivierung neben Histonen auch Nicht-Histonproteine, wie beispielsweise Faktoren des generellen Transkriptionsapparates, das Ziel der HAT-Aktivität von p300/CBP sind. Untersuchungen von Imhoff und seinen Mitarbeitern (1997) erbrachten den Nachweis, daß die RAP30-Untereinheit des generellen Transkriptionsfaktors TF_{II}F durch die Koaktivatoren p300/CBP acetyliert wird. Das Protein RAP30 bildet mit der Untereinheit RAP74 den generellen Transkriptionsfaktor TF_{II}F, der durch seine intrinsische ATP-abhängige DNA-Helicase-Aktivität zu einer Entspiralisierung des DNA-Doppelstranges führt und dadurch entscheidende Funktionen in der Initiation und Elongation der Transkription durch die RNA-Polymerase II besitzt (als Übersicht s. Orphanides *et al.*, 1996). Die RAP30-Untereinheit wäre hier von besonderem Interesse, da unsere Arbeitsgruppe gezeigt hat, daß die RAP30-Untereinheit mit dem E1A_{12S}-Protein interagiert (Lipinski *et al.*, 1998). Vorstellbar wäre, daß sich in der E1A_{12S}-induzierten Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors der Acetylierungszustand der RAP30-Untereinheit ändert. Da die RAP30-Untereinheit an der Transkriptionsinitiation beteiligt ist, könnte die Acetylierung der RAP30-Untereinheit die Transkriptionsrate am E2_{Ad12}-Promotor erhöhen. Experimente zur Klärung dieser Fragestellung sind bereits geplant und sollen demnächst durchgeführt werden.

Zur Aktivierung der Genexpression durch Histonacetyltransferasen sind drei Modelle vorgeschlagen worden (als Übersicht s. Struhl, 1998). In den drei Modellen wird hierbei unterschieden, ob Histonacetyltransferasen unspezifisch, generell oder spezifisch an Promotoren rekrutiert werden. Das vorgeschlagene Modell der promotorspezifischen Rekrutierung von Histonacetyltransferasen durch sequenzspezifisch DNA-bindende Transkriptionsfaktoren im Aktivierungsprozeß von Zielgenen steht hierbei im Einklang mit

meinen vorgestellten Ergebnissen. In Übereinstimmung mit diesem Modell zeigen meine Untersuchungen, daß die Acetylasen p300/CBP durch die kombinierten Interaktionen von CREB und dem E1A_{12S}-Protein an das E2-CRE des E2_{Ad12}-Promotors rekrutiert werden. Die anschließende Aktivierung der HAT-Aktivität von p300/CBP durch das E1A_{12S}-Protein würde die nukleosomartige Struktur des Virusgenoms destabilisieren und eine effiziente Expression der E2-Region im Replikationszyklus des Adenovirus-Serotyps 12 ermöglichen.

5.2 Die E1A_{12S}-vermittelte Translokation der RII α -Untereinheit des PKA-Holoenzym als Voraussetzung für die Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors

Eine Voraussetzung für die Aktivierung cAMP-induzierbarer Gene durch den cAMP/PKA-abhängigen Signaltransduktionsweg ist die spezifische Phosphorylierung der CRE-bindenden Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1 durch die freigesetzte C-Untereinheit des PKA-Holoenzym (Hagiwara *et al.*, 1993). Phosphoryliertes CREB-1 oder ATF-1 interagiert daraufhin mit den Koaktivatoren p300/CBP, was zu einer Aktivierung des Zielgens führt (Chrivia *et al.*, 1993). Als Gegenspieler der Phosphotransferase-Aktivität der freien C-Untereinheit dient PKI, die durch den Export der C-Untereinheit aus dem Kern einer Aktivierung cAMP-abhängiger Promotoren durch die PKA entgegenwirkt (Fantozzi *et al.*, 1994).

Da PKI in transienten Expressionsanalysen die E1A_{12S}-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors reprimierte (s. Kap. 4.4), legte das die Vermutung nahe, daß ein weiterer Schritt in dem Aktivierungsprozeß des viralen Promotors durch das E1A_{12S}-Protein notwendig ist. Aufgrund der Ergebnisse mit dem PKA-Inhibitor PKI wurde angenommen, daß eine Interaktion mit Faktoren des PKA-Holoenzym zu einer Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors führen könnte.

Der klassischen Ansicht nach sind die E1A-Proteine im Zellkern lokalisiert, wo sie ihre transkriptionsregulierenden Funktionen durch die Interaktion mit DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren oder Koaktivatoren vermitteln (als Übersicht s. Bayley und Mymryk, 1994). Im Rahmen dieser Arbeit haben wir in Kooperation mit Kjetil Taskén (Institute of Medical Biochemistry, University of Oslo, Oslo, Norwegen) erstmals den Nachweis erbracht, daß das E1A_{12S}-Protein eine wichtige cytoplasmatische Funktion ausübt, die zur Aktivierung eines Zielgens führt. Wir haben gezeigt, daß das E1A_{12S}-Protein mit den cytoplasmatisch-lokalisierten regulatorischen Untereinheiten RI α und RII α des PKA-Holoenzym *in vitro* und *in vivo* interagiert (s. Kap. 4.14 und 4.15). Die Anwesenheit des E1A_{12S}-Proteins führt in den transfizierten Zellen zu einer Translokation der perinukleär-lokalisierten RII α -Untereinheit des cAKII-Holoenzym in den Zellkern (s. Kap. 4.16). Dagegen war die zelluläre Lokalisation der RI α -Untereinheit des cAKI-Holoenzym in Anwesenheit des adenoviralen Proteins nicht beeinflusst (s. Kap. 4.16). Die funktionelle Konsequenz der Translokation bewiesen wir in transienten Expressionsstudien, die zeigten, daß die Koexpression des E1A_{12S}-Proteins und der RII α -Untereinheit zu einer starken Aktivierung des E2_{Ad12}-

Promotors führte (s. Kap. 4.17; P. Fax, C. R. Carlson, P. Collas, K. Taskén, H. Esche, und D. Brockmann, eingereicht zur Publikation). Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse stellen eines der wenigen Beispiele dafür dar, daß Faktoren mit ursprünglich cytoplasmatischen Funktionen durch die Rekrutierung an Promotoren als Kofaktoren an der Regulation spezifischer Gene im Zellkern beteiligt sein können. In diesem Zusammenhang zeigt die RII α -Untereinheit Analogie mit den Cytoskelett-Proteinen β -Catenin (ein Cadherin-bindendes Protein) und CASK (ein membrangebundenes Protein der Guanylatcyclase), die durch Transkriptionsfaktoren im Aktivierungsprozeß von Zielgenen in den Zellkern translozieren (als Übersicht s. Bredt, 2000; Behrens *et al.*, 1996; Hsueh *et al.*, 2000). Diese Beispiele belegen eindeutig, daß Faktoren, die ursprünglich cytoplasmatische Funktionen ausüben, durch die Rekrutierung von viralen oder zellulären Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Funktion als Kofaktoren in der Aktivierung von Zielgenen vermitteln.

Der Mechanismus, wie das E1A_{12S}-Protein durch eine Translokation der RII α -Untereinheit die Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors bewirkt, ist dagegen noch unklar. Nach unseren Ergebnissen muß das adenovirale Protein die RII α -Untereinheit in den Zellkern translozieren. Hierdurch kann die RII α -Untereinheit erst stimulierend in die Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors eingreifen. Denkbar wäre, daß das E1A_{12S}-Protein die Rekrutierung der RII α -Untereinheit an den E2_{Ad12}-Promotor ermöglicht. Da das E1A_{12S}-Protein mit CREB und p300/CBP einen ternären Komplex auf dem E2-CRE bildet, wäre eine Möglichkeit, daß das adenovirale Protein die RII α -Untereinheit an den Promotor rekrutiert. Die Ergebnisse der Protein-Protein-Interaktionsstudien zeigen, daß das E1A_{12S}-Protein über den AKAP-Bindebereich im N-Terminus (As 1-91) an die RII α -Untereinheit bindet. Durch die Bindung an AKAPs wird das PKA-Holoenzym an spezifischen Kompartimenten intrazellulär lokalisiert (Dell'Acqua und Scott, 1997). Die subzelluläre Lokalisierung des PKA-Holoenzym in unmittelbarer Nähe spezifischer Substrate wird als ein entscheidender Mechanismus betrachtet, eine selektive Phosphorylierung auf bestimmte zelluläre Signale hin zu gewährleisten (als Übersicht s. Gray *et al.*, 1998 und Referenzen hierin). Daher ist es vorstellbar, daß das E1A_{12S}-Protein als ein nukleäres AKAP entweder auf dem E2-CRE oder im Kern fungiert und dadurch die RII α -Untereinheit an den Promotor rekrutiert. Im weiteren Verlauf könnte die RII α -Untereinheit dann die C-Untereinheit an den Promotor binden. Möglicherweise wird hierdurch eine intranukleäre Neuverteilung der C-Untereinheit an den E2_{Ad12}-Promotor bewirkt und damit einhergehend eine Lokalisation der Phosphotransferase-Aktivität der PKA in unmittelbare Nähe zu den E2-CRE-gebundenen Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1 und den Koaktivatoren p300/CBP. In diesem Prozeß würde es zu einer Phosphorylierung der promotorgebundenen Faktoren durch die C-Untereinheit kommen. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese reprimieren die spezifischen Inhibitoren der C-Untereinheit, PKI und H-89, die E1A_{12S}-induzierte Transkription des E2-Promotors (s. Kap. 4.4 und 4.13).

Das entscheidende Substrat der Phosphotransferase-Aktivität der PKA ist jedoch bisher nicht bekannt. Da CREB eines der wesentlichen Substrate der PKA im Zellkern ist, haben wir untersucht, ob der Phosphorylierungsstatus von CREB in transient E1A_{12S}-

transfizierten Zellen verändert ist. Interessanterweise zeigten unsere Experimente, daß der Phosphorylierungszustand von CREB unverändert ist (Daten nicht gezeigt). Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß eine Änderung im Phosphorylierungszustand von CREB in transient E1A_{12S}-exprimierenden Zellen zu gering ist, um diese in Western-Blot-Analysen detektieren zu können. Neben der Phosphorylierung von CREB besteht die Möglichkeit, daß die phosphorylierungsabhängige Aktivierung anderer Faktoren durch die C-Untereinheit für die Transkriptionsinduktion des E2_{Ad12}-Promotors notwendig ist. Weitere Faktoren, die als ein potientes Substrat der Phosphotransferase-Aktivität der C-Untereinheit der PKA in Betracht gezogen werden müssen, sind die Koaktivatoren p300/CBP (s. Kap. 5.1).

In Übereinstimmung mit dieser Vermutung wird das Transaktivierungspotential von CBP als ein Gal4-Fusionsprotein auf einem Gal4-abhängigen Promotor durch die C-Untereinheit der PKA in transienten Expressionsstudien aktiviert (Chrivia *et al.*, 1993). Die Mutation der PKA-Konsensussequenz, die interessanterweise in der HAT-Domäne von CBP lokalisiert ist, führt zu einem Verlust des Koaktivators, die cAMP-induzierte Aktivierung von Zielpromotoren zu vermitteln (Xu *et al.*, 1998). Dieses Ergebnis unterstreicht die Notwendigkeit der PKA-vermittelten Phosphorylierung von CBP im Aktivierungsprozeß CRE-abhängiger Zielgene. Inwiefern die Phosphorylierung des C-Terminus von CBP (oder p300) durch die PKA die HAT-Aktivität des Koaktivators beeinflusst, ist gegenwärtig noch nicht untersucht. Das läßt aber die Vermutung zu, daß die PKA-vermittelte Phosphorylierung, ähnlich wie die Phosphorylierung von CBP durch CyclinE-cdk2 (s. Kap. 5.1), zu einer Aktivierung der HAT-Funktion des Koaktivators führen könnte.

Weiterhin wurde in Arbeiten von Hu und seinen Mitarbeitern (1999) der Nachweis erbracht, daß neben dem C-Terminus eine weitere PKA-induzierbare Transaktivierungsdomäne im N-Terminus von CBP lokalisiert ist. Die Phosphorylierung dieser Domäne durch die C-Untereinheit der PKA führte auch hier zu einer starken Aktivierung eines heterologen Promotors. Daß eine Phosphorylierung von CBP für die Aktivierung CREB-abhängiger Promotoren entscheidend ist, wurde zudem durch Untersuchungen von Chawla *et al.* (1998) belegt. Wie ihre Analysen zeigten, sind in der CREB/CBP-induzierten Genexpression zwei Aktivierungsschritte notwendig. Neben der Phosphorylierung von CREB und der daraus resultierenden Rekrutierung von CBP, muß der rekrutierte Koaktivator durch ein Ca²⁺- oder ein cAMP-Signal aktiviert werden, um in den Transkriptionsprozeß stimulierend eingreifen zu können. Im Einklang mit diesen Untersuchungen wurde in früheren Arbeiten von Ginty *et al.* (1991) in einer PKA-defizienten Zelllinie gezeigt, daß Ca²⁺ über CaM-Kinasen zwar eine Phosphorylierung von CREB bewirkt, daß aber für die Induktion der Expression des c-fos-Gens eine aktive PKA essentiell ist. Diese Ergebnisse bekräftigen die Annahme, daß im Aktivierungsprozeß CREB-abhängiger Zielgene die PKA-induzierten Phosphorylierungen von Koaktivatoren wie z. B. p300/CBP oder Faktoren des generellen Transkriptionsapparates essentiell sind. Hiernach wäre das Phosphorylierungsziel der über den E1A_{12S}/RII α -Komplex rekrutierten C-Untereinheit der PKA nicht CREB, sondern die Koaktivatoren p300/CBP. Obwohl wir bisher nur Hinweise für solch einen Aktivierungsmechanismus besitzen, würde die phosphorylierungsabhängige Stimulation von p300/CBP durch die C-Untereinheit, bei

einem unveränderten Phosphorylierungszustand von CREB, die starke Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors in Anwesenheit der RII α -Untereinheit durch das E1A_{12S}-Protein erklären. Ob es durch die E1A_{12S}-vermittelte Translokation der RII α -Untereinheit zu einer Veränderung des Phosphorylierungszustands und damit zu einer Stimulation der Koaktivatorfunktionen wie z. B. der HAT-Aktivität von p300/CBP kommt, soll durch zukünftige Experimente geklärt werden.

Alternativ zu der zuvor beschriebenen Rekrutierung durch das E1A_{12S}-Protein könnte die RII α -Untereinheit auch direkt mit promotorgebundenen Faktoren interagieren. Eine Möglichkeit wäre, daß die RII α -Untereinheit mit den E2-CRE-gebundenen Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1 interagiert. Diese Vermutung scheint aber eher fraglich, da Daten von Srivastava *et al.* (1998) beweisen, daß die RII β -Untereinheit, jedoch nicht die RII α -Untereinheit, mit CREB-1 einen Komplex auf einem CRE-Konsensus-Promotorelement *in vitro* bildet. Aufgrund dieser Ergebnisse und daß die RII α -Untereinheit nur in Anwesenheit des E1A_{12S}-Proteins eine Kofaktorfunktion in der Induktion des E2_{Ad12}-Promotors besitzt, favorisieren wir den zuvor diskutierten Aktivierungsmechanismus.

Eine noch ungeklärte Frage ist, ob das E1A_{12S}-Protein nur die RII α -Untereinheit oder ein intaktes cAKII-Holoenzym vom Cytoplasma in den Zellkern transloziert. Erste Experimente bezüglich dieser Fragestellung deuten darauf hin, daß das cAKII-Holoenzym in Abwesenheit von cAMP nicht durch das E1A_{12S}-Protein in die R- und C-Untereinheiten *in vitro* dissoziiert (P. Fax, F. Herberg und D. Brockmann, bisher unpublizierte Daten). Jedoch zeigten unsere Untersuchungen, daß die Expression des E1A_{12S}-Proteins die Konzentration der C-Untereinheit im Zellkern wahrscheinlich nicht verändert (s. Kap. 4.16). Das könnte einerseits bedeuten, daß die nukleäre Konzentration der C-Untereinheit aufgrund aktiver Exportmechanismen (z. B. durch PKI) im Gleichgewichtszustand gehalten wird. Andererseits besteht jedoch die Möglichkeit, daß das E1A_{12S}-Protein mit perinukleären RII α -Untereinheiten interagiert, die nicht mit der C-Untereinheit assoziiert sind. Hierbei könnte es durch den kolokalisierten E1A_{12S}/RII α -Komplex im Zellkern zu einer intranukleären Umverteilung der C-Untereinheit an den Promotor kommen.

Die Ergebnisse, daß nur die RII α -Untereinheit, jedoch nicht die RI α -Untereinheit in Anwesenheit des E1A_{12S}-Proteins in den Kern transloziert, lassen vermuten, daß das E1A_{12S}-Protein eine funktionelle Spezifität für die RII α -Untereinheit *in vivo* hat. Warum die RI α -Untereinheit in Anwesenheit des E1A_{12S}-Proteins nicht in den Kern transloziert (s. Kap. 4.16), obwohl hier die Protein-Protein-Bindungsstudien eine Interaktion zeigen (s. Kap. 4.15), ist bisher nicht bekannt. In Bezug auf unsere Ergebnisse der Translokation der RII α -Untereinheit in der E1A_{12S}-vermittelten Aktivierung des viralen Promotors sind frühere Studien mit somatischen Zelllinien interessant, die Mutationen in den PKA-Untereinheiten enthielten (als Übersicht siehe Beebe, 1994 und Referenzen hierin). Diese Experimente gaben erste Hinweise darauf, daß nur bestimmte cAK-Holoenzyme an der Regulation cAMP-spezifischer

Prozesse beteiligt sind. Die Untersuchungen wurden später erweitert und belegten, daß in cAKII-defizienten Zellen, die allerdings ein intaktes cAKI-Holoenzym enthielten, die cAMP-induzierte Genexpression nicht vermittelt wird (Montminy *et al.*, 1986, Tortora und Chong, 1990, Ginty *et al.*, 1991). Nach dem heutigen Wissensstand geht man davon aus, daß die über die AKAPs an die äußere Kernmembran lokalisierten cAKII-Holoenzyme für die Regulation der cAMP-vermittelten Genexpression entscheidend sind (Paolillo *et al.*, 1999 und Referenzen hierin).

5.3 Modell der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein

Wie ich in der vorliegenden Arbeit gezeigt habe, wird der E2_{Ad12}-Promotor durch das E1A_{12S}-Protein über zwei voneinander abhängige Aktivierungsschritte reguliert. Hierbei greifen die kernlokalisierten (s. Kap. 5.1) und die cytoplasmatischen (s. Kap. 5.2) Aktivitäten des E1A_{12S}-Proteins im Prozeß der Transkriptionsaktivierung des E2_{Ad12}-Promotors effizient ineinander. Faßt man die von mir vorgestellten Daten zusammen, kann man ein hypothetisches Zwei-Stufen-Aktivierungsmodell der E1A_{12S}-induzierten Transkription des viralen Promotors ableiten (Abb. 31). Nach dem Modell ist das E1A_{12S}-Protein an der Bildung eines Multiproteinkomplexes im Aktivierungsprozeß des E2_{Ad12}-Promotors beteiligt, der die CRE-bindenden Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1 und die Koaktivatoren p300/CBP enthält (s. Kap. 5.1; Fax *et al.*, 2000). Die Aktivierung der HAT-Funktion der rekrutierten Koaktivatoren p300/CBP spielt hierbei eine entscheidende Rolle in der Induktion des Promotors durch das E1A_{12S}-Protein (P. Fax, O. Lehmkuhler, C. Kühn, H. Esche und D. Brockmann, eingereicht zur Publikation). Jedoch zeigen die im zweiten Teil meiner Arbeit präsentierten Ergebnisse, daß die Rekrutierung der HAT-Funktion von p300/CBP für die Transkriptionsaktivierung des E2_{Ad12}-Promotors nicht ausreichend ist. Mit der Bildung des Multiproteinkomplexes im Aktivierungsprozeß des E2_{Ad12}-Promotors ist aber ein zweites, phosphorylierungsabhängiges Aktivierungssignal durch das E1A_{12S}-Protein nötig, um die effiziente Aktivierung des viralen Promotors zu gewährleisten. Somit vermittelt das E1A_{12S}-Protein über einen Zwei-Stufen-Mechanismus eine Aktivierung des viralen Promotors. Im ersten Aktivierungsschritt bewirkt das E1A_{12S}-Protein eine Translokation der cytoplasmatisch-lokalisierten RII α -Untereinheit des PKA-Holoenzym in den Zellkern. Im zweiten Aktivierungsschritt ist das E1A_{12S}-Protein an der Bildung eines transkriptionell-aktiven Multifaktorkomplexes auf dem E2-CRE beteiligt (Abb. 31). Die durch das E1A_{12S}-Protein an den Promotor rekrutierte RII α -Untereinheit dient als Adapter für die nukleäre C-Untereinheit, die hierdurch die Phosphotransferase-Aktivität der PKA an den Promotor bindet. Die C-Untereinheit-induzierte Phosphorylierung und die damit verbundene Aktivierung z. B. der Koaktivatoren p300/CBP (Xu *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 1999), ist das entscheidende zweite Aktivierungssignal für die Transkription des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein.

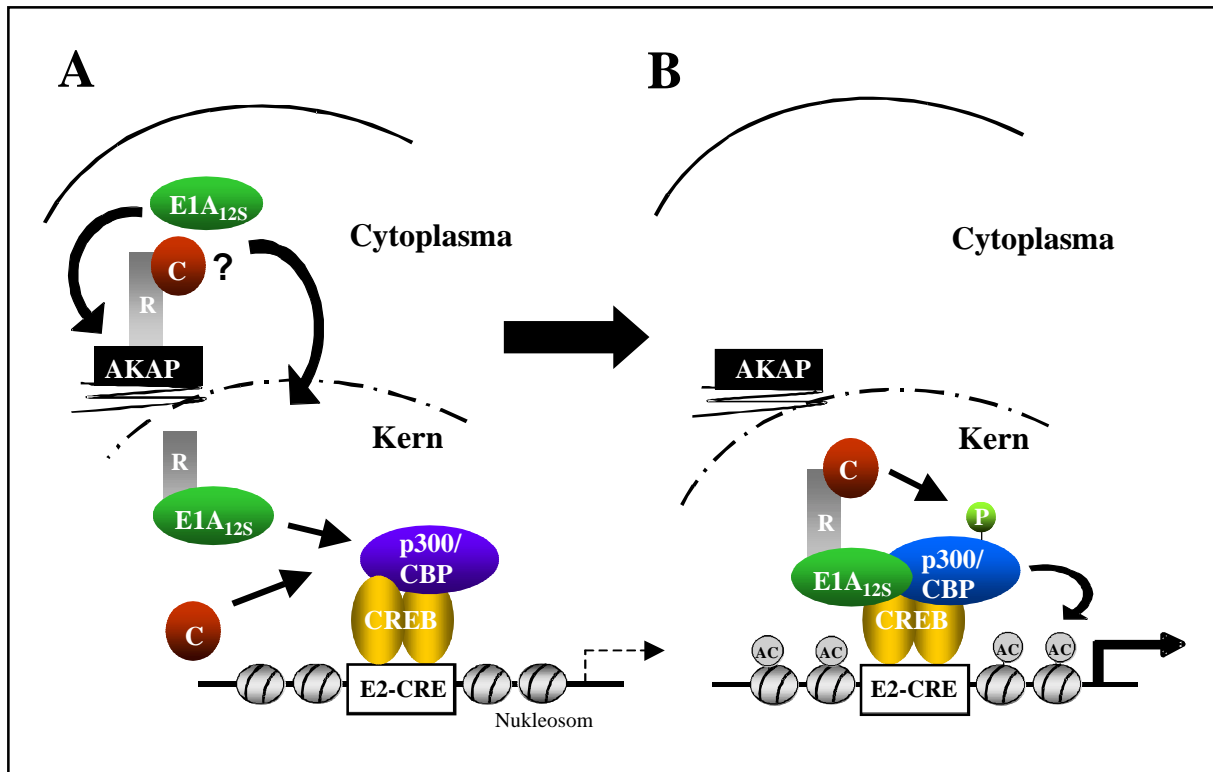


Abb. 31. Hypothetisches Modell der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein. Die cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1 (hier zusammenfassend als CREB dargestellt) und die Koaktivatoren p300/CBP sind für die Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors in KB-Zellen notwendig. Zu Beginn des Aktivierungsprozesses (A) des viralen Promotors bewirkt die Interaktion des E1A_{12S}-Proteins mit dem cytoplasmatischen PKA-Holoenzym eine Translokation der cytoplasmatischen RII α -Untereinheit (R) in den Zellkern (ob dies auch zu einer Translokation der C-Untereinheit führt, ist gegenwärtig noch nicht geklärt und wird durch ein Fragezeichen [?] symbolisiert). Im weiteren Verlauf des Aktivierungsprozesses (B) kommt es durch das adenovirale Protein auf dem E2-CRE zur Bildung eines Multifaktorkomplexes und zur Rekrutierung der nukleären C-Untereinheit (C) durch die promotorgebundene RII α -Untereinheit. Die anschließende Phosphorylierung (P) der Koaktivatoren p300/CBP durch die C-Untereinheit ist das entscheidende Transkriptionsaktivierungssignal. Diese Phosphorylierung bewirkt eine Stimulation der intrinsischen HAT-Funktion von p300/CBP, gefolgt von einer Acetylierung (Ac) der Histone im Prozeß der Transkriptionsaktivierung des E2_{Ad12}-Promotors. AKAP: „A-Kinase anchoring protein“.

Die hier präsentierten Ergebnisse geben neue Einblicke in die molekularen Mechanismen, wie E1A-Proteine durch die Bindung sowohl an cytoplasmatisch- als auch kernlokalisierte Faktoren des cAMP/PKA-abhängigen Signaltransduktionswegs in diese zelluläre Signalkette eingreifen können. In diesem Prozeß werden die entscheidenden Schaltstellen der cAMP-abhängigen Genexpression, nämlich die Koaktivatoren p300/CBP und das PKA-Holoenzym, durch das E1A_{12S}-Protein beeinflusst und im Zuge der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors effizient miteinander verknüpft. Hierdurch besitzt das Virus die Möglichkeit, das für die Aktivierung CRE-abhängiger Zielgene notwendige cAMP-Signal zu umgehen. Aufgrund der signal-unabhängigen Aktivierung des ubiquitären cAMP/PKA-Signaltransduktionswegs kann das Virus die konstitutive Expression replikationsrelevanter Faktoren der E2-Region bewirken, aber auch gleichzeitig proliferationsinduzierende Prozesse initiieren, die eine Voraussetzung für eine optimale Virusvermehrung in der infizierten Zelle sind.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Im Verlauf des lytischen Entwicklungszyklus 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.

Wie ich in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt habe, interagiert das E1A_{12S}-Protein im Aktivierungsprozeß des E2_{Ad12}-Promotors mit cytoplasmatisch- und kernlokalisierten Faktoren des cAMP/PKA-abhängigen Signaltransduktionswegs. Die durch das adenovirale Protein induzierten Prozesse im Zellkern und im Cytoplasma werden bei der Aktivierung dieses viralen Promotors effizient koordiniert.

Im ersten Teil der Arbeit habe ich nachgewiesen, daß der E2_{Ad12}-Promotor über ein CRE-Promotorelement (als E2-CRE bezeichnet) reguliert wird. Das E2-CRE ist das entscheidende Promotorelement sowohl für die basale wie auch für die E1A_{12S}-vermittelte Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors. Die Aktivierung des viralen Promotors durch das E1A_{12S}-Protein wird hierbei durch die N-terminale Transaktivierungsdomäne (unter Beteiligung der Aminosäuren Asparaginsäure, Isoleucin und Leucin an den Positionen 16, 18 und 19) und die CR1-Domäne vermittelt. Weiterführende Untersuchungen bezüglich des Aktivierungsmechanismus des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein zeigten, daß das E2-CRE von den cAMP/PKA-abhängigen Transkriptionsfaktoren CREB-1 und ATF-1 gebunden wird. In transienten Expressionsanalysen bewies ich, daß diese Transkriptionsfaktoren für die Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein von entscheidender Bedeutung sind. In Protein-Protein-Interaktionsstudien konnte ich den Nachweis erbringen, daß das E1A_{12S}-Protein an die Transkriptionsfaktoren CREB-1 und ATF-1 und die für diese Transkriptionsfaktoren essentiellen zellulären Koaktivatoren p300/CBP *in vitro* und *in vivo* bindet. Ausgehend von diesen Analysen zeigte sich, daß es im Verlauf des Aktivierungsprozesses auf dem E2-CRE des E2_{Ad12}-Promotors zur Bildung eines Proteinkomplexes bestehend aus CREB-1/ATF-1, p300/CBP und dem E1A_{12S}-Protein kommt. In den Analysen bezüglich des Aktivierungsmechanismus über diesen Proteinkomplex bewies ich, daß die Histonacetyltransferase-Aktivität der promotor-gebundenen Koaktivatoren p300/CBP für die Transaktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein entscheidend ist. Meine Untersuchungen zur Modulation der HAT-Aktivität von p300/CBP durch das adenovirale Protein zeigten, daß das E1A_{12S}-Protein die HAT-Aktivität von CBP aktiviert. Wie meine Daten zudem verdeutlichten, sind die durch die Koaktivatoren p300/CBP vermittelten Acetylierungsprozesse im Aktivierungsprozeß des viralen Promotors durch das E1A_{12S}-Protein notwendig. Als ein Substrat dieser Acetylierungsprozesse wurde das Histonprotein H4 identifiziert. Zusammenfassend konnte ich im ersten Teil der vorliegenden Arbeit eine eindeutige Korrelation bezüglich der Fähigkeit des E1A_{12S}-Proteins den E2_{Ad12}-Promotor zu transaktivieren, mit einer HAT-Aktivität gebunden vorzuliegen und mit den Koaktivatoren p300/CBP zu interagieren, nachweisen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde von mir ein völlig neuer Mechanismus der E1A_{12S}-vermittelten Regulation CRE-abhängiger Promotoren durch eine Interaktion mit dem cytoplasmatisch-lokalisierten PKA-Holoenzym ermittelt.

So zeigen meine Untersuchungen erstmalig, daß das E1A_{12S}-Protein cytoplasmatische Funktionen besitzt, die für die Transaktivierung des E2_{Ad12}-Promotors notwendig sind. In diesen Untersuchungen habe ich den Nachweis erbracht, daß das PKA-Holoenzym in der Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein eine entscheidende Funktion ausübt, wobei der Phosphotransferase-Aktivität der C-Untereinheit in diesem Prozeß eine wichtige Rolle zukommt. In den nachfolgenden Analysen zur Aufklärung des Aktivierungsmechanismus über die Interaktion des adenoviralen Proteins mit dem PKA-Holoenzym habe ich bewiesen, daß das E1A_{12S}-Protein an die regulatorischen Untereinheiten RI α und RII α des PKA-Holoenzym *in vitro* und *in vivo* bindet. Die Interaktion des E1A_{12S}-Proteins verläuft hier über die AKAP-Bindedomäne der RI α - und RII α -Untereinheit. Durch Immunfluoreszenz-Untersuchungen und Western-Blot-Analysen wurde gezeigt, daß die RII α -Untereinheit, jedoch nicht die RI α -Untereinheit, in Anwesenheit des E1A_{12S}-Proteins in den Zellkern transloziert. Zudem zeigte sich in diesen Experimenten, daß die Lokalisation der C-Untereinheit durch die Bindung an die RII α -Untereinheit unbeeinflusst war. Die funktionelle Bedeutung dieser E1A_{12S}-vermittelten Translokation der RII α -Untereinheit in den Zellkern im Aktivierungsprozeß des E2_{Ad12}-Promotors wurde von mir in transienten Expressionsstudien nachgewiesen. Hier führte die gleichzeitige Expression der RII α -Untereinheit und des E1A_{12S}-Proteins zu einer starken Aktivierung des E2_{Ad12}-Promotors, wodurch der Nachweis erbracht wurde, daß die RII α -Untereinheit eine wichtige Kofaktorfunktion in der Aktivierung des CRE-abhängigen E2_{Ad12}-Promotors durch das adenovirale Protein ausübt. Nach diesen Untersuchungen ist gegenwärtig davon auszugehen, daß die RII α -Untereinheit durch das E1A_{12S}-Protein an den viralen Promotor rekrutiert wird und dort als ein Adapter für die C-Untereinheit dient. Die Phosphorylierung und Aktivierung von promotorgebundenen Faktoren durch die C-Untereinheit der PKA, wie z. B. den Koaktivatoren p300/CBP, ist für die Transaktivierung des E2_{Ad12}-Promotors durch das E1A_{12S}-Protein von entscheidender Bedeutung.

Ausgehend von meinen Ergebnissen soll zukünftig untersucht werden, wie das E1A_{12S}-Protein die Funktion Chromatin-remodellierender (z. B. SWI/SNF) und Chromatin-modifizierender (z. B. Acetylasen wie p300/CBP) Multifaktorkomplexe im Aktivierungsprozeß CRE-abhängiger Zielgene im Zellgenom reguliert. Als Modellsystem zum Studium dieser Mechanismen soll der in meiner Arbeit charakterisierte E2_{Ad12}-Promotor dienen. Die für diese Fragestellungen notwendigen Zelllinien mit stabil integrierten E2_{Ad12}-Promotorkonstrukten werden gegenwärtig in unserer Arbeitsgruppe etabliert. Durch diese Zelllinien erhoffen wir nicht nur neue Erkenntnisse über die Aktivierungsmechanismen des E2_{Ad12}-Promotors durch den E1A_{12S}/RII α -Komplex zu erhalten, sondern auch Einblicke in die prinzipiellen Regulationsprozesse zellulärer Gene des cAMP/PKA-Signaltransduktionswegs.

7. Literaturverzeichnis

- Aaronheim, A., Zandi, E., Hennemann, H., Elledge, S. J. und Karin, M. (1997):** Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 3049-3102.
- Adams, P. D. und Kaelin, W. G. (1998):** Negative control elements of the cell cycle in human tumors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 791-797.
- Ahn, S., Olive, M., Aggarwal, S., Krylov, D., Ginty, D. D. und Vinson, C. (1998):** A dominant-negative inhibitor of CREB reveals that is a general mediator of stimulus-dependent transcription of c-fos. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 967-977.
- Ait-Si-Ali, S., Ramirez, S., Barre, F.-X., Dkhissi, F., Magnaghi-Jaulin, L., Girault, J. A., Robin, P., Knibieler, M., Pritchard, L. L., Ducommun, B., Trouche, D. und Harrel-Bellan, A. (1998):** Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle-dependent kinases and oncoprotein E1A. *Nature* **396**: 184-186.
- Angel, P. und Karin, M. (1991):** The role of Jun, Fos and AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochem. Biophys. Acta* **1072**: 129-157.
- 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.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E. et al., eds. (1997):** Current protocols in molecular biology. New York: Wiley.
- Avantaggiati, M. L., Okryzko, V. V., Gardner, K., Giordano, A., Levine, A. S. und Kelly, K. (1997):** Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* **89**: 1175-1184.
- Bailey, A. und Mautner, V. (1994):** Phylogenetic relationships among Adenovirus serotyps. *Virology* **205**: 438-452.
- Bannister, A. J. und Kouzarides, T (1995):** CBP-induced stimulation of c-Fos activity is abrogated by E1A. *EMBO J.* **14**: 4758-4762.
- Bannister, A. J. und Kouzarides, T. (1996):** The CBP-coactivator is a histone acetyltransferase. *Nature* **384**: 641-643.
- Bayley, S. T. und Mymryk, J. S. (1994):** Adenovirus E1A proteins and transformation. *Int. J. Oncol.* **5**: 425-444.
- Beebe, S. J. (1994):** The cAMP-dependent protein kinases and cAMP signal transduction. *Sem. Cancer Biol.* **5**: 285-294.
- Behrens, J., von Kries, J. P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. und Birchmeier, W. (1996):** Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**: 638-642.
- Berk, A. J. (1986):** Adenovirus promoters and E1A transactivation. *Ann. Rev. Genet.* **20**: 45-79.

- Berk, A. J. (1999):** Activation of RNA polymerase II transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**: 330-5.
- Berk, A. J. und Sharp P. A. (1978):** Structure of the adenovirus 2 early mRNAs. *Cell* **17**: 935-944.
- 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.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979):** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513
- Boyer, T. G., Martin, M. E., Lees E., Ricciardi, R. P. und Berk, A. J. (1999):** Mammalian Srb/Mediator complex is targeted by adenovirus E1A protein. *Nature* **399**: 276-279.
- Boyes, J. P., Byfield, Y., Nakatani, Y. und Ogryzko V. V. (1998):** Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature* **396**: 594-598.
- Braunstein, M., Rose, A. B., Holmes, S. G., Allis, C. D. und Broach, J. R. (1993):** Transcriptional silencing is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes Dev.* **7**: 4592-4604.
- Bredt, D. S. (2000):** Reeling CASK into the nucleus. *Nature* **404**: 241-242.
- Brockmann, D., Pützer, B. M., Lipinski, K. S., Schmäcker U. und Esche, H. (1999):** A multiprotein complex consisting of the cellular coactivator p300, AP-1/ATF, as well as NFκB is responsible for the activation of the mouse major histocompatibility class I (H-2K^b) Enhancer A. *Gene Expression* **8**: 1-18.
- 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/III**: 81-113.
- 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^b) activity by the adenovirus type 12-unique 52R E1A protein. *Oncogene* **12**: 1715-1725.
- Brockmann, D., Tries, B. und Esche, H. (1990):** Isolation and characterisation of novel adenovirus type 12 mRNAs by cDNA PCR technique. *Virology* **179**: 585-590.
- Broker, T. R., Keller, C. C. und Roberts, R. J. (1984):** Human adenovirus serotyps 2, 4, 8, 40 and 41 and adenovirus-simian virus 40 hybrids. In: *Genetic maps*, Vol. 3 (O' Brian, S. J., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 99-110.
- Brownell, J. E. und Allis, C. D. (1995):** An activity gel assay detects a signal, catalytically active histone acetyltransferase subunit in Tetrahymena macronuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 6364-6368.
- Chakravarti, D., Okryzko, V. V., Kao, H.-Y., Nash, A., Chen, H., Privalsky, M. L., Nakatani, Y. und Evans, R. M. (1999):** A viral mechanism for inhibition of p300 and P/CAF acetyltransferase activity. *Cell* **96**: 393-403.

- Chawla, S., Hardingham, G.E., Quinn, D.R., und Bading, H. (1998):** CBP: A signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV. *Science* **281**: 1505-1509.
- Chen, H., Lin, R. J., Xie, D., Wilpitz, D. und Evans, R. M. (1999):** Regulation of hormone-induced hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* **98**: 675-686.
- Chevray, P. M. und Nathans, D. (1992):** Protein cloning in yeast: Identification of mammalian proteins that react with leucine zipper of Jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5789-5793.
- Chijiwa, T., Mishima, A., Hagiwara, M., Sano, M., Hayashi, K., Inoue, T., Naito, K., Toshioka, T. und Hidaka, H. (1990):** Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamid (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* **265**: 5267-5272.
- Chrivia, J. C., Kwok, R. P. S., Lamb, N., Haniwawa, M., Montminy, M. R. und Goodman, R. H. (1993):** Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* **365**: 855-859.
- Cobrinik, D. (1996):** Regulatory interactions among E2Fs and cell cycle control proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **208**: 13-30.
- Day, R. N., Walder, J. A. und Maurer, R. A. (1989):** A protein kinase inhibitor gene reduces both basal and multihormone-stimulated prolactin gene transcription. *J. Biol. Chem.* **264**: 431-436.
- Dedon, P. C., Soultz, J. A., Allis, C. D. und Gorovsky, M. A. (1991):** A simplified formaldehyde fixation and immunoprecipitation technique for studying protein-DNA interactions. *Anal. Biochem.* **197**: 83-90.
- Dell'Acqua, M. L. und Scott, J. D. (1997):** Protein kinase A anchoring. *J. Biol. Chem.* **272**: 12881-12884.
- Dery, C.V., Toth, M., Brown, M., Horvath, J., Allaire, S. und Weber J. M (1985):** The structure of adenovirus chromatin in infected cells. *J. Gen. Virol.* **66**: 2671-84.
- Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. und Roeder, R. G. (1983):** Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* **11**: 1475-1489.
- Doerfler, W. (1969):** Nonproductive infection of baby hamster kidney cells (BHK21) with adenovirus type 12. *Virology* **38**: 587-606.
- 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.
- Eagle, H. (1955):** Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma strain KB. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **89**: 362.

Eckner, R., Ewen, M. E., Newsome, D., Gerdes, M., DeCaprio, J. A., Lawrence, J. B. und Livingston, D.M. (1994): Molecular cloning and functional analysis of the Adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev.* **8**: 869-884.

Esche, H. und Siegmann, B. (1982): Expression of early viral gene products in adenovirus type 12-infected and -transformed cells. *J. Gen. Virol.* **60**: 99-113.

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.

Evans, R. M., Fraser, N., Ziff, E., Weber, J., Wilson, M. und Darnell, J. E. (1977): The initiator sites for RNA transcription in Ad2 DNA. *Cell* **12**: 733-739.

Fantozzi, D. A., Harootunian, A. T., Wen, W., Taylor, S. S., Feramisco, J. R., Tsien, R. Y. und Meinkoth, J. L (1994): Thermostable inhibitor of cAMP-dependent protein kinase enhances the rate of export of the kinase catalytic subunit from the nucleus. *J. Biol. Chem.* **269**: 2676-2686.

Fax, P. (1997): Regulation der frühen E2e Promotoren der Adenovirus Serotypen 12 und 2 durch die Ad12 E1A-Proteine. *Diplomarbeit der Ruhr-Universität Bochum, Fakultät für Biologie.* Angefertigt am Universitätsklinikum der Universität GH Essen, Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung).

Fax, P., Lipinski, K. S., Esche, H. und Brockmann, D. (2000): cAMP-independent activation of the Adenovirus type 12 E2 promoter correlates with the recruitment of CREB-1/ATF-1, E1A_{12S}, and CBP to the E2-CRE. *J. Biol. Chem* **275**: 8911-8920.

Ferguson, B., Krippel, B., Andrisani, O., Jones, N., Westphal, H. und Rosenberg, M. (1985): E1A 13S and 12S mRNA products made in Escherichia coli both function as nucleus-localized transcription activators but do not directly bind DNA. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 2653-2661.

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.

Florin-Christensen, M., Missero, C., Florin-Christensen, J., Tranque, P., Ramon y Cajal, S. und Dotto, G. P (1993): Counteracting effects of E1a transformation on cAMP growth inhibition. *Exp. Cell Res.* **207**: 57-61.

Gariglio, P., Llopis, R., Oudet, P. und Chambon P. (1979): The template of the isolated native simian virus 40 transcriptional complexes is a minichromosome. *J. Mol. Biol.* **131**:75-105.

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.

Ginty, D. D., Glowacka, D., Bader, D. S., Hidaka, H. und Wagner, J. D. (1991): Induction of immediate early genes by Ca²⁺ influx requires cAMP-dependent protein kinase in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **266**: 17454-17458.

- Giordano, A. und Avantaggiati, M. L. (1999):** p300 and CBP: Partners for life and death. *J. Cell. Physiol.* **181**: 218-230.
- Gluzman, Y. (1981):** SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**: 175-82.
- Gonzales, G. A. und Montminy, M. R. (1989):** Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at Serine 133. *Cell* **59**: 675-680.
- Gray, P. C., Scott, J. D. und Catterall, W. A. (1998):** Regulation of ion channels by cAMP-dependent protein kinase and A-kinase anchoring proteins. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8**: 330-334.
- Grunstein, M. (1997):** Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**: 349-352.
- Gu, W., Shi, X. L. und Roeder, R. G. (1997):** Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* **387**: 819-822.
- Gu, W. und Roeder, R. G. (1997):** Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation on the C-terminal domain. *Cell* **90**: 595-606.
- 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.
- Hai, T. und Curran, T. (1991):** Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 3720-3724.
- Hamamori, Y., Sartorelli, V., Ogryzko, V., Puri, P. L., Wu, H. Y., Wang, J. Y. J., Nakatani, Y. und Kedes, L. (1999):** Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and the adenoviral oncoprotein E1A. *Cell* **96**: 405-413.
- Harada, H., Becknell, B., Wilm, M., Mann, M., Huang, L. J., Taylor, S. S., Scott, J. D. und Korsmeyer, S. J. (1999):** Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol. Cell.* **3**: 413-422.
- Hausken, Z. E., Dellacqua, M. L., Coghlan, V. M. und Scott, J. D. (1996):** Mutational analysis of the A-kinase anchoring protein (AKAP)-binding site on RII - Classification of side chain determinants for anchoring and isoform selective association with AKAPs. *J. Biol. Chem.* **271**: 29016-29022.
- He, S., Cook, B. L., Deverman, B. E., Weihe, U., Zhang, F., Prachand, V., Zheng, J. und Weintraub, S. J. (2000):** E2F is required to prevent inappropriate S-phase entry of mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 363-371.
- Heinemeyer, T., Chen, X., Karas, H., Kel, A. E., Kel, O.V., Liebich, I., Meinhardt, T., Reuter, I., Schacherer, F. und Wingender, E. (1998):** Expanding the TRANSFAC database towards an expert system of regulatory molecular mechanisms. *Nucleic Acids Res.* **26**: 364-370.

- Hoeffler, J. P., Lustbader, J. W. und Chen, C. Y. (1991):** Identification of multiple nuclear factors that interact with cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein and activating transcription factor-2 by protein-protein interactions. *Mol. Endocrinol.* **5**: 256-266.
- Horwitz, M. S. (1990):** Adenovirus. In: *Virology* (Fields, B. N. & Knipe, D. M., eds), Raven Press, New York, pp. 1723-1740.
- 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.
- 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.
- Hsueh, Y.-P., Wang, T.-F., Yang, F.-C. und Sheng, M. (2000):** Nuclear translocation and transcription by the membrane-associated guanylate kinase CASK/Lin-2. *Nature* **404**: 298-302.
- Hu, S. C., Chrivia, J. und Ghosh, A (1999):** Regulation of CBP-mediated transcription by neuronal calcium signaling. *Neuron* **22**: 799-808.
- Huang, L. J., Durick, K., Weiner, J. A., Chun, J. und Taylor, S. S. (1997):** Identification of a novel protein kinase A anchoring protein that binds both type I and type II regulatory subunits. *J. Biol. Chem.* **272**: 8057-8064.
- Ikeda, M. A. und Nevins, J. R. (1993):** Identification of distinct roles for separate domains in disruption of E2F-complexes. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 7029-7035.
- Imhof, A., Yang, X. J., Ogryzko, V. V., Nakatani, Y., Wolffe, A. P. und Ge, H. (1997):** Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr. Biol.* **7**: 689-692.
- Janknecht, R. und Hunter, T. (1996):** A growing coactivator network. *Nature* **383**: 22-23.
- Jones, N.C., Rigby, P. W. und Ziff, E. B (1988):** Trans-acting protein factors and the regulation of eukaryotic transcription: lessons from studies on DNA tumor viruses. *Genes Dev.* **2**: 267-281.
- Kawasaki, H., Eckner, R., Yao, T. P., Taira, K., Chiu, R., Livingston, D. M. und Yokoyama, K. K. (1998):** Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation. *Nature* **393**: 284-289.
- Keryer, G., Skålhegg, B. S., Landmark, B. F., Hansson, V., Jahnsen, T. und Taskén, K. (1999):** Differential localization of protein kinase A type II isozymes in the Golgi-centrosomal area. *Exp. Cell. Res.* **249**: 131-146.
- Kim, T. K. und Maniatis, T. (1997):** The mechanism of transcriptional synergy of an in vitro assembled interferon-beta enhanceosome. *Mol. Cell.* **1**: 119-129.

- 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.
- Kitabayashi, I., Eckner, R., Arany, Z., Chiu, R., Gachelin, G., Livingston, D. M. und Yokoyama, K. K. (1995):** Phosphorylation of the adenovirus E1A-associated 300 kDa protein in response to retinoic acid and E1A during the differentiation of F9 cells. *EMBO J.* **17**: 3496-3509.
- Klebe, R. J., Harriss, J. V., Sharp, Z. D. und Douglas, M. G. (1983):** A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene* **25**: 333.
- Kornberg, R. D. (1974):** Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**: 868-871.
- Kornberg, R. D. und Lorch, Y. (1999):** Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **98**: 285-294.
- 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 functions. *Science* **279**: 703-707.
- Kovar, H. (1999):** E1A and the Ewing tumor translocation. *Nat. Med.* **5**: 1331.
- Kung, A. L., Rebel, V. I., Bronson R. T., Ch'ng, L. E., Sieff, C. A., Livingston, D. M. und Yao, T. P. (2000):** Gene dose-dependent control of hematopoiesis and hematologic tumor suppression by CBP. *Genes Dev.* **14**: 272-277.
- Kurokawa, R., Kalafus, D., Ogliastro, M.H., Kioussi, C., Xu, L., Torchia, J., Rosenfeld, M. G. und Glass C. K. (1998):** Differential use of CREB binding protein-coactivator complexes. *Science* **279**: 700-703.
- Kwok, R. P., Lundblad, J. R., Chrivia, J.C., Richards, J. P., Bachinger, H. P., Brennan, R. G., Roberts, S. G., Green, M. R. und Goodman, R. H. (1994):** Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* **370**: 223-226.
- Laemmli, U. K. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- 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.
- Lee, J. S., Zhang, X. und Shi, Y. (1996):** Differential interactions of the CREB/ATF family of transcription factors with p300 and adenovirus E1A. *J. Biol. Chem.* **271**: 17666-17674.
- Leon, D. A., Herberg, F. W., Banky, P. und Taylor, S. S. (1997):** A stable alpha-helical domain at the N terminus of the RIalpha subunits of cAMP-dependent protein kinase is a novel dimerization/docking motif. *J. Biol. Chem.* **272**: 28431-28437.
- Lester, L. B., Langeberg, L. K. und Scott, J. D. (1997):** Anchoring of protein kinase A facilitates hormone-mediated insulin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 14942-14947.

- Leza, M. A. und Hearing, P. (1989):** Independent cyclic AMP and E1A induction of adenovirus early region 4 expression. *J. Virol.* **63**: 3057-3064.
- 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.
- Lin, R.-Y., Moss, S. B. und Rubin, C. S. (1995):** Characterization of S-AKAP84, a novel developmentally regulated A kinase anchor protein of male germ cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 27804-27811.
- Lipinski, K. S., Esche, H. und 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.
- Lipinski, K. S., Fax, P., Wilker, B., Hennemann, H., Brockmann, D. und 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**: 94-105.
- Lipinski, K. S., Kröner-Lux, G., Esche, H. und Brockmann, D. (1997):** The E1A N-terminus of the highly-oncogenic adenovirus type 12 harbors a *trans*-activation function not detectable in the non-oncogenic serotype 2. *J. Gen. Virol.* **78**: 413-421.
- 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.
- Londberg-Holm, K. und Philipson, L. (1969):** Early events of virus-cell interactions in an adenovirus system. *J. Virol.* **4**: 323-338.
- Lucher, L. A., Loewenstein, P. M. und Green, M. (1985):** Phosphorylation in vitro of Escherichia coli-produced 235R and 266R tumor antigens encoded by human adenovirus type 12 early transformation region 1A. *J. Virol.* **56**: 183-193.
- Luckow, B. und Schütz, G. (1987):** CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* **13**: 5490.
- 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.
- Luo, R. X., Postigo, A. A. und Dean, D. C. (1998):** Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* **92**: 463-473.
- 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.
- Melot, T. und Delattre, O. (1999):** E1A and the Ewing tumor translocation. *Nat. Med.* **5**: 1331.
- Montminy, M. R, Sevarino, K. A., Wagner, J. A., Mandel, G. und Goodman, R. H. (1986):** Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 6682-6686.

- Montminy, M. R. (1997):** Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 807-822.
- Moran, E. (1994):** Mammalian cell growth controls reflected through protein interactions with the adenovirus E1A gene products. *Sem. Virol.* **5**: 327-340.
- Munshi, N., Merika, M., Yie, J., Senger, K., Chen, G. und Thanos, D. (1998):** Acetylation of HMG I(Y) by CBP turns off IFN beta expression by disrupting the enhanceosome. *Mol. Cell.* **2**: 457-467.
- Nakajima, T., Uchida, C., Anderson, S. F., Lee, C. G., Hurwitz, J., Parvin, J. D. und Montminy, M. (1997):** RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell* **90**: 1107-1112.
- 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.
- Newlon, M. G., Roy, M., Morikis, D., Hausken, Z. E., Coghlan, V., Scott, J. D. und Jennings, P. A. (1999):** The molecular basis for protein kinase A anchoring revealed by solution NMR. *Nat. Struct. Biol.* **6**: 222-2227.
- Norrby, E., Bartha, A. und Boulanger, P. (1976):** Adenoviridae. *Intervirology* **7**: 117-125.
- Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H. und Nakatani, Y. (1996):** The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* **87**: 953-959.
- Orphanides, G., Lagrange, T. und Reinberg, D. (1996):** The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* **10**: 2657-2683.
- Paolillo, M., Feliciello, A., Porcellini, A., Garbi, C., Bifulco, M., Schinelli, S., Ventra, C., Stabile, E., Ricciardelli, G., Schettini, G. und Avvedimento, E. V (1999):** The type and the localization of cAMP-dependent protein kinase regulate transmission of cAMP signals to the nucleus in cortical and cerebellar granule cells. *J. Biol. Chem.* **274**: 6546-6552.
- Pastan, I., Seth, P., Fitzgerald, D. und Willingham, M. (1987):** Adenovirus entry into cells: some new observations on an old problem. In: *Concepts in viral pathogenesis* (Notkins A., Oldstone MBA, eds.), Springer Verlag, New York, pp 141-146.
- Perissi, V., Dasen, J. S., Kurokawa, R., Wang, Z. Korzus, E., Rose, D. W., Glass, C. K. und Rosenfeld, M. G. (1999):** Factor-specific modulation of CREB-binding protein acetyltransferase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 3652-3657.
- Perricaudet, M., Le Moullec, J., Toillais, P. und Petterson, U. (1980):** Structure of two adenovirus type 12 transforming polypeptides and their evolutionary implications. *Nature* **288**: 174-176.
- Philipson, L. (1983):** Structure and assembly of adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **109**: 1-53

- 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.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M. und Spiegelman, B. M. (1998):** A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**: 829-839.
- Puri, P. L., Sartorelli, V., Yang, X. J., Hamamori, Y., Ogryzko, V. V., Howard, B. H., Kedes, L., Wang, J. Y., Graessmann, A., Nakatani, Y. und Levrero, M. (1998):** Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol. Cell.* **1**: 35-45.
- Reid, J. L., Bannister, A. J., Zegerman, P., Martinez-Balbas, M. A. und Kouzarides, T. (1998):** E1A directly binds and regulates the P/CAF acetyltransferase. *EMBO J.* **17**: 4469-4477.
- Richter, J. D., Slavicek, J. M., Schneider, J. F. und Jones, N. C. (1988):** Heterogeneity of adenovirus type 5 E1A proteins: multiple serine phosphorylations induce slow-migrating electrophoretic variants but do not affect E1A-induced transcriptional activation or transformation. *J. Virol.* **62**: 1948-1955.
- Roelvink, P. W., Lizonova, A., Lee, J. G., Li, Y., Bergelson, J. M., Finberg, R. W., Brough, D. E., Kovesdi, I. und Wickham, T. J. (1998):** The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J. Virol.* **72**: 7909-7915.
- 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.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989):** Molecular cloning: a laboratory manual, second edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Prieto, R., de Alava, E., Palomino, T., Guinea, J., Fernandez, V., 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-FLI1. *Nat. Med.* **5**: 1076-1079.
- 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.
- Sawada, Y. und Fujinaga, K. (1980):** Mapping of adenovirus 12 mRNAs transcribed from the transforming region. *J. Virol.* **36**: 639-651.
- Shenk, T. (1996):** Adenoviridae: the Viruses and their replication. In: *Fundamental Virology*, Third Edition, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, *et al.* Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA.
- Skålhegg, B. S., Taskén, K., Hansson, V., Huitfeldt, H. S., Jahnsen, T. und Lea, T. (1994):** Location of cAMP-dependent protein kinase type I with the TCR-CD3 complex. *Science* **263**: 84-87.

- Slansky, J. E. und Farnham, P. J. (1996):** Introduction to the E2F family: Protein structure and gene regulation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **208**: 13-30.
- Smith, C. L., Onate, S. A., Tsai, M. J. und O'Malley, B. W. (1996):** CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 8884-8888.
- Snowden, A. W. und Perkins, N. D. (1998):** Cell cycle regulation of the transcriptional coactivators p300 and CREB binding protein. *Biochem. Pharmacol.* **55**: 1947-1954.
- Somasundaram, K. und El-Deiry, W. S. (1997):** Inhibition of p53-mediated transactivation and cell cycle arrest by E1A through its p300/CBP-interacting region. *Oncogene* **6**: 1047-1057.
- Sprengel, J., Schmitz, B., Heuss-Neitzel, D., Zock, C. und Doerfler, W. (1994):** Nucleotide sequence of human Adenovirus Type 12 DNA: comparative functional analysis. *J. Virol.* **68**: 379-389.
- Srivastava, R. K., Lee, Y. N., Noguchi, K., Park, Y. G., Ellis, M. J. C., Jeong, J.-S., Kim, S. N. und Cho-Chung, Y. S. (1998):** The RII β regulatory subunit of protein kinase A binds to cAMP response element: An alternative cAMP signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 6687-6692.
- Struhl, K. (1998):** Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Devel.* **12**: 599-606.
- Sussenbach, J. S. und van der Vliet, P. C. (1983):** The mechanisms of adenovirus DNA replication and the characterization of replication proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **109**: 53-75.
- Swaminathan, S. und Thimmapaya, B. (1995):** Regulation of adenovirus E2 transcription unit. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199/III**: 177-194.
- Tan, T-H., Jia, R. und Roeder, R. G. (1989):** Utilization of signal transduction pathway by human T-cell leukemia virus type I transcriptional activator tax. *J. Virol.* **63**: 3761-3768.
- Taskén, K., Skålhegg, B. S., Taskén, K. A., Solberg, R., Knutsen, H. K., Levy, F. O., Sandberg, M., Orstavik, S., Larsen, T., Johansen, A. K., Vang, T., Schrader, H. P., Reinton, N. T., Torgersen, K. M., Hansson, V. und Jahnsen, T. (1997):** Structure, function, and regulation of human cAMP-dependent protein kinases. In: *Signal Transduction in Health and Disease, Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research*, pp 191-204, J. Corbin and S. Francis, eds. (Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers).
- Taylor, S. S., Buechler, J. A. und Yonemoto, W. (1990):** cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 971-1005.
- Torchia, J., Glass, C. und Rosenfeld, M. G. (1998):** Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 373-383.
- Tortora, G. und Cho-Chung, Y. S. (1990):** Type II regulatory subunit of protein kinase restores cAMP-dependent transcription in a cAMP-unresponsive cell line. *J. Biol. Chem.* **265**: 18067-18070.

- Trendelenburg, G., Hummel, M., Riecken, E. O. und Hanski, C. (1996):** Molecular characterization of AKAP149, a novel a kinase anchor protein with a KH domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**: 313-319.
- Trouche, D. und Kouzarides, T. (1996):** E2F1 and E1A_{12S} have a homologous activation domain regulated by RB and CBP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 1439-1442.
- van Dam, H., Duyndam, M., Rottier, R., Bosch, A., de Vries-Smits, L., Herrlich, P., Zantema, A., Angel, P. und van der Eb, A. J. (1993):** Heterodimer formation of c-Jun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. *EMBO J.* **12**: 479-487.
- van Dam, H., Offringa, R., Meijer, I., Stein, B., Smits, A. M., Herrlich, P., Bos, J. L. und van der Eb, A. J. (1990):** Differential effects of the adenovirus E1A oncogene on members of the AP-1 transcription factor family. *Mol. Cell Biol.* **10**: 5857-5864.
- van der Eb, A. J. und Bernards, R. (1984):** Transformation and oncogenicity by adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **110**: 23-51.
- Wadell, G. (1984):** Molecular epidemiology of adenovirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **110**: 191-220.
- Wang, H. G. H., Rikitake, Y., Carter, M. C., Abraham, S. E., Zerler, B. und Moran, E. (1993):** Identification of specific adenovirus E1A N-terminal residues critical to the binding of cellular proteins and to the control of cell growth. *J. Virol* **67**: 476-488.
- Watson, J., Hopskins, N., Roberts, J., Steitz, J. und Weiner, A. (1987):** In: *Molecular biology of the gene*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Melo Park, California, USA.
- Wen, W., Meinkoth, J. L., Tsien, R. Y. und Taylor, S. S. (1995):** Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* **82**: 463-473.
- White, E. (1995):** Regulation of p53-dependent apoptosis by E1A and E1B. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199/III**: 33-59.
- Whittaker, J. L., Byrd, P. J., Grand, R. J. und Gallimore, P. H. (1984):** Isolation and characterization of four adenovirus type 12-transformed human embryo kidney cell lines. *Mol. Cell Biol.* **4**: 110-116.
- 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.
- Xu, L., Lavinsky, R. M., Dasen, J. S., Flynn, S. E., McInerney, E. M., Mullen, T. M., Heinzl, T., Szeto, D., Korzus, E., Kurokawa, R., Aggarwal, A. K., Rose, D. W., Glass, C. K. und Rosenfeld, M. G. (1998):** Signal-specific co-activator domain requirements for Pit-1 activation. *Nature* **395**: 301-306.
- Yamamoto, K. K., Gonzalez, G. A., Menzel, P., Rivier, J. und Montminy, M. R. (1990):** Characterization of a bipartite activator domain in transcription factor CREB. *Cell* **60**: 611-617.

Yang, X. J., Ogryzko, V. V., Nishikawa, J., Howard, B. H. und Nakatani, Y. (1996): A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**: 319-324.

Yao, T. P., Ku, G., Zhou, N., Scully, R. und Livingston, D. M. (1996): The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 10626-10631.

Yao, T. P., Oh, S. P., Fuchs, M., Zhou, N. D., Ch'ng, L. E., Newsome, D., Bronson, R. T., Li, E., Livingston, D. M. und Eckner, R. (1998): Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell* **93**: 361-372.

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.

Zhang, S., Mak, S. und Branton, P. E. (1995): Adenovirus type 12 early region 1B proteins and metabolism of viral mRNAs. *Virology* **191**: 793-802.

8. Eigene Publikationen

Ein Teil der beschriebenen Ergebnisse dieser vorliegenden Arbeit, die durch Sachbeihilfen der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und dem IFORES-Programm der Medizinischen Einrichtungen der Universität-Gesamthochschule Essen gefördert wurden, sind zur Publikation eingereicht oder liegen bereits in publizierter Form vor:

Lipinski, K. S., Fax, P., Wilker, B., Hennemann, H., Brockmann, D. und 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**: 94-105.

Fax, P., Lipinski, K. S., Esche, H. und Brockmann, D. (2000): cAMP-independent activation of the Adenovirus type 12 E2 promoter correlates with the recruitment of CREB-1/ATF-1, E1A_{12S}, and CBP to the E2-CRE. *J. Biol. Chem* **275**: 8911-8920.

Fax, P., Lehmkuhler, O., Kühn, C., Esche, H. und Brockmann, D. (2000): E1A_{12S}-mediated activation of the Adenovirus type 12 E2 promoter depends on the HAT-activity of p300/CBP. *Zur Publikation eingereicht.*

Fax, P., Carlson, C. R., Collas, P., Taskén, K., Esche, H. und Brockmann, D. (2000): Cellular Redistribution of the PKA-R Subunit: A Novel Mechanism of Adenovirus E1A_{12S} to Activate PKA-dependent Gene Expression. *Zur Publikation eingereicht.*

9. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Peter Fax
 Anschrift: Riekenbank 11, 45359 Essen
 Geburtsdatum/-ort: 08.02.1970 in Essen
 Familienstand: ledig, ein Sohn

Ausbildung

Schule

August 1976- Juni 1980 Grundschole Haus-Berge, Essen
 August 1980-Juli 1986 Realschole Bertha-Krupp, Essen
Abschluß: Fachoberschulreife
 August 1986- Mai 1989 Gymnasium Essen-Stoppenberg des Bistums Essen
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Beruf

August 1989-Juni 1992 Ausbildung zum Ver- und Entsorger -
 Fachrichtung Abwasserentsorgung, Ruhrkohle AG (RAG)
Abschluß: staatlich geprüfter Ver- und Entsorger

Universität

September 1992-Oktober 1997 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
 Diplomarbeit zum Thema „Regulation der frühen E2e-Promotoren der Adenovirus-Serotypen 12 und 2 durch die Ad12 E1A-Proteine“
Abschluß: Diplom-Biologe

seit November 1997 mit dem Antritt einer Stelle als wissenschaftlicher Mitarbeiter Beginn der vorliegenden Promotion am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung) des Universitätsklinikums der Universität-Gesamthochschule Essen

Essen, 19.06.2000

10. Erklärungen

Erklärung zu § 6, Abs. 2, Nr. 7:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema:

„Der Adenovirus-Typ 12 E2-Promotor:

Ein Modell zur Untersuchung der Modulation des cAMP/PKA-abhängigen Signaltransduktionswegs durch das Ad12 E1A_{12S}-Onkoprotein“

zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Peter Fax befürworte.

Essen, den _____

Prof. Dr. H. Esche

Erklärung zu § 6, Abs. 2, Nr. 6:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 19.06.00 _____

Peter Fax

Erklärung zu § 6, Abs. 2, Nr. 8:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und daß diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 19.06.00 _____

Peter Fax

Danksagung

*Erstaunlich viele Menschen haben zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen,
kein Wunder bei der schwierigen „Geburt“ einer Doktorarbeit:*

Sehr Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Esche für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut anfertigen zu können. Weiterhin möchte ich ihm für seine anregende Unterstützung und seiner begeisterten Diskussionsbereitschaft während meiner Promotionszeit danken.

Ermutigung ganz direkter Art, vor allem dann, wenn man zu Beginn einer Promotion keine Ahnung hat, was im Verlauf dieses Vorhabens auf einen zukommt, erwies mir Herr Priv.-Doz. Dr. Dieter Brockmann: Er hat mich darin bestärkt, daß das Thema wichtig sei und es sich auch gut bearbeiten lasse. Ihm gilt besonderer Dank für seine immerwährende engagierte und freundschaftliche Unterstützung. Weiterhin möchte ich ihm für seine intensive Betreuung und fruchtbare wissenschaftliche Kritik herzlichst danken, die einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen meiner Arbeit hatte.

Sehr zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Dipl.-Biol. Oliver Lehmkuhler für die äußerst enge, freundschaftliche und herzlich-erfrischende Zusammenarbeit im grauen Laboralltag sowie seiner unermüdlichen kritischen und akribischen Korrektur meiner Arbeit.

Meinen lieben Kolleginnen Frau Dr. rer. nat. Alexandra Dickopp und Frau Dipl.-Ing. Silke Kullmann möchte ich für ihre immerwährende Hilfe und ihre Unterstützung in jeder Laborsituation sowie ihren kritischen Ratschlägen bezüglich meiner Arbeit danken.

Frau Claudine Kühn und Frau Ulla Schmücker danke ich für ihre hervorragende technische Mithilfe bei der Durchführung meiner Experimente.

Meinen anderen „ersten Lesern“, Frau Rechtsanwältin Ingeborg Franzkowiak und Priv.-Doz. Dr. Friedhelm Achenbach, danke ich sehr für ihre Bemühungen, meine Arbeit zu korrigieren. Es versteht sich von selbst, daß alle dennoch nicht ausgemerzten Fehler einzig und allein auf mein Konto gehen.

Dr. Kjetil Taskén danke ich für seine enge Zusammenarbeit.

Dank gilt auch den zahlreichen, nicht namentlich erwähnten Wissenschaftlern für die problemlose Bereitstellung verschiedener Plasmide oder Antikörper, die für eine erfolgreiche Durchführung meiner Experimente notwendig waren.

Dank der DFG und dem IFORES für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Vor allem gilt mein tiefster Dank Babette und Jonas für ihre Liebe, ihre Geduld und ihr Verständnis für meine Arbeit, die uns leider viel voneinander fernhielt.