

Institut für Molekularbiologie
(Tumorforschung)

**Evaluation der Tumorsuppressoraktivität
transformationsdefekter Adenovirus-Serotyp 5 E1A-
Mutanten**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Alexandra Dickopp
aus Mülheim an der Ruhr
im Januar 2000

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

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Esche

2. Gutachter: Priv. Doz. Dr. B. Opalka

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. W. Burghardt

Tag der mündlichen Prüfung: 10.05.2000

DANKSAGUNGEN

Herrn Prof. Dr. H. Esche danke ich für die Überlassung des Themas meiner Arbeit, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für seine stetige Diskussionsbereitschaft.

Bertram und Hans-Christoph danke ich besonders herzlich für die Betreuung und insbesondere für die vielfältigen Anregungen und hilfreichen Diskussionen, die zum Fortgang dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Den ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, Achim, Christine, Claudine, Dieter, Kai, Silke, Silvia, Ulla und Uschi danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt meinen lieben Kollegen Oliver und Peter, die für eine anhaltend gute Stimmung im Labor gesorgt und mir stets freundschaftlich zur Seite gestanden haben. Ihre kritischen Anmerkungen haben die Lesbarkeit dieser Arbeit mit Sicherheit verbessert.

Meinen Eltern danke ich im Besonderen für die immerwährende Unterstützung.

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Adenoviren	2
1.2 Die frühe Region 1A (E1A) des Adenovirus-Serotyps 5 (Ad5)	3
1.3 Transaktivierung viraler und zellulärer Gene durch E1A-Proteine.....	6
1.4 Transkriptionelle Repression viraler und zellulärer Gene durch E1A-Proteine.....	7
1.5 Immortalisierung und Transformation durch E1A-Proteine.....	8
1.6 Tumorsuppression durch E1A-Proteine	9
1.7 Suppression der Transformation primärer Nagerzellen durch E1A-Proteine.....	9
1.8 Suppression der Tumorigenität neoplastischer Zellen durch E1A-Proteine.....	11
1.9 Suppression des Metastasierungspotentials neoplastischer Zellen durch E1A-Proteine.....	11
1.10 Apoptoseinduktion durch E1A-Proteine.....	13
1.11 Sensibilisierung neoplastischer Zellen gegenüber DNA-schädigenden Substanzen durch E1A-Proteine	15
1.12 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	16
2 MATERIAL	18
2.1 Chemikalien	18
2.2 Enzyme und Peptide	19
2.3 Antikörper.....	20
2.4 Radiochemikalien.....	21
2.5 Kits und Reagenzien	21
2.6 Molekulargewichtstandards.....	21
2.7 Lösungen und Materialien für die Zellkultur.....	22
2.8 Besondere Verbrauchsmaterialien	22
2.9 Spezielle Geräte.....	23
2.10 Verwendete Puffer und Lösungen.....	23
2.11 Bakterienstämme (<i>E. coli</i>)	30
2.12 Zelllinien	30
2.13 Vektoren.....	31

2.14	Reporterplasmide	31
2.15	Oligonukleotide	31
3	METHODEN	32
3.1	Klonierungstechniken	32
3.1.1	Herstellung transformationskompetenter E. coli-Bakterien.....	32
3.1.2	Transformation kompetenter E. coli-Bakterien	32
3.1.3	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus E. coli-Bakterien	33
3.1.3.1	Mini-Päparation	33
3.1.3.2	Maxi-Präparation	33
3.1.4	Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	34
3.1.5	Dephosphorylierung von geschnittener Plasmid-DNA	34
3.1.6	Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel.....	34
3.1.7	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	35
3.1.8	Ligation von DNA mit überhängenden Enden	35
3.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase-chain-reaction, PCR).....	36
3.2.1	Aufreinigung der in der PCR amplifizierten DNA	36
3.2.2	Synthese der Ad5 13S-cDNA mittels reverser PCR	37
3.2.3	Konstruktion der Ad5 E1A-Mutanten mittels PCR	37
3.2.4	Identifizierung Insert-positiver Bakterienklone mit Hilfe der PCR (PCR-Screening).....	38
3.3	Kultivierung von Zelllinien.....	38
3.3.1	Bestimmung der Zellzahl.....	39
3.3.2	Präparation primärer Mausnierenzellen	39
3.4	Transfektion von Zellen	39
3.4.1	Elektroporation	39
3.4.2	Lipofektion.....	40
3.5	Koloniebildung G418-resistenter Zellen	40
3.6	Herstellung stabiler E1A-exprimierender Zelllinien.....	41
3.7	Kultivierung von Zellen im Weichagar	41
3.8	Aufreinigung von Nukleinsäuren	42
3.8.1	Präparation genomischer DNA aus Eukaryontenzellen und Tumorgewebe	42
3.8.2	DNA-Quantifizierung	43
3.8.3	Präparation von RNA	43

3.8.4	Quantifizierung der RNA	43
3.8.5	Überprüfung der RNA-Qualität	44
3.9	Northern-Blotting	44
3.10	Southern-Blotting (Southern, 1975).....	44
3.11	cDNA-Sonden für die Hybridisierung.....	45
3.12	Radioaktive Markierung von DNA	45
3.13	Hybridisierung von RNA	45
3.14	Hybridisierung von DNA.....	46
3.15	Proteinchemische Methoden.....	47
3.15.1	Herstellung von Proteinextrakten aus Eukaryontenzellen	47
3.15.2	Herstellung von Proteinextrakten aus Tumorgewebe.....	47
3.15.3	Proteinquantifizierung	48
3.15.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	48
3.15.5	Western-Blotting (Harlow und Lane, 1988)	48
3.15.6	Zymographie	49
3.16	Invasionsversuche.....	50
3.17	Bestimmung der Luciferase-Reportergen-Aktivität in Zellextrakten.....	51
3.18	Tierversuche	52
3.18.1	Haltungsbedingungen	52
3.18.2	Xenotransplantate	52
3.18.3	Aufarbeitung des Tumorgewebes	52
3.19	Cisplatin- und Doxorubicinbehandlung eukaryontischer Zellen.....	53
3.19.1	Messung der in vitro-Toxizität mit dem MTT-Test	53
3.19.2	DNA-Fragmentierung zum Apoptose-Nachweis.....	54
3.20	Statistische Analyse	54
4	ERGEBNISSE	55
4.1	E1A-Mutanten	55
4.1.1	Die Mutante E1A _{delCR2}	56
4.1.2	Die Mutante E1A _{CR3Ex2}	57
4.1.3	Die Mutante E1A _{Ex2}	57
4.2	Funktionalität der E1A-Konstrukte.....	58
4.3	Untersuchung des Transformationspotentials der E1A-Mutanten	59
4.4	Charakterisierung der BLM- und H1299-Zelllinien bezüglich des HER-2/neu-Status	61

4.5	Koloniebildung E1A-transfizierter BLM- und H1299-Zelllinien.....	62
4.6	Etablierung konstitutiv E1A-exprimierender Zelllinien	65
4.6.1	Etablierung der E1A-exprimierenden BLM-Zelllinien.....	66
4.6.2	Kontrolle der Unabhängigkeit der E1A-exprimierenden BLM-Zelllinien.....	66
4.6.3	Etablierung der konstitutiv E1A-exprimierenden H1299-Zelllinien.....	67
4.6.4	Expression der E1A-Konstrukte in den etablierten Zelllinien.....	68
4.7	Morphologie der E1A-exprimierenden Zelllinien.....	70
4.8	Expression von Tumormarkern in E1A-exprimierenden BLM- und H1299-Zelllinien	73
4.9	Proliferationsverhalten der E1A-exprimierenden Zelllinien.....	76
4.10	Wachstum der E1A-exprimierenden Zelllinien in Weichagar.....	79
4.11	Tumorigenität der E1A-exprimierenden Zelllinien in vivo	82
4.11.1	Tumorigenität der BLM-Zelllinien	82
4.11.2	Tumorigenität der E1A-exprimierenden H1299-Zelllinien.....	86
4.12	Expressionsanalyse der E1A-Proteine in den Tumoren der BLM- und H1299-Zelllinien	88
4.13	Präsenz der E1A-cDNA in Tumoren.....	89
4.14	Chemosensibilisierung der BLM- und H1299-Zelllinien durch die konstitutive Expression der E1A-Mutanten.....	91
4.14.1	Sensibilisierung gegenüber der Cisplatinbehandlung	91
4.14.2	Sensibilisierung gegenüber der Doxorubicinbehandlung	97
4.15	Metastasierungspotential der E1A-exprimierenden BLM- und H1299-Zelllinien	102
4.15.1	Überprüfung der Invasivität der E1A-exprimierenden BLM- und H1299-Zellen.....	102
4.15.2	Aktivität der Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) in E1A-exprimierenden BLM-Zellen	105
4.15.3	Expression des Metastasierungssuppressors KAI1	107
4.16	Einfluss der Expression E1A-Konstrukte auf die transkriptionelle Regulation des p53-Gens.....	109
4.17	Einfluss der Expression der E1A-Konstrukte auf die transkriptionelle Kontrolle des <i>hTERT</i> -Gens in BLM- und H1299-Zellen.....	110

5 DISKUSSION	114
5.1 Suppression der Tumorigenität durch E1A-Proteine	115
5.2 Sensibilisierung gegenüber der Wirkung von Zytostatika durch E1A-Proteine.....	121
5.3 Einfluss der E1A-Proteine auf das Metastasierungspotential.....	124
5.4 Einfluss der E1A-Proteine auf die Aktivität des humanen <i>p53</i> -Promotors	127
5.5 Einfluss der E1A-Proteine auf die Aktivität des <i>hTERT</i> -Promotors	129
5.6 Ausblick.....	131
6 ZUSAMMENFASSUNG	132
7 LITERATURVERZEICHNIS	134
8 PUBLIKATIONEN	153
9 LEBENSLAUF	154
10 ERKLÄRUNGEN.....	155

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A. bidest	Aqua bidest (zweifach destilliertes Wasser)
Ad	Adenovirus
AP	Aktivierendes Protein
Apaf-1	Apoptose-Protease aktivierender Faktor-1
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Hilfsregion (auxilliary region)
Arg	Arginin
As	Aminosäure
ATF	Aktivierender Transkriptionsfaktor
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
BMK-Zellen	Nierenzellen neonataler Mäuse (baby mouse kidney)
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel, 1 Bq = 1 radioaktiver Zerfall/Sekunde
BRK	Nierenzellen neonataler Ratten (baby rat kidney)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
°C	Grad Celsius
cAMP	Zyklisches Adenosin-5`-monophosphat
CAR	Cocksackievirus-Adenovirus-Rezeptor
CBP	CREB bindendes Protein
cDNA	Zur RNA komplementäre DNA (complementary DNA)
CIAP	Alkalische Phosphatase (calf intestinal alkaline phosphatase)
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
CoA	Koenzym A
cpm	Radioaktive Impulse pro Minute (counts per minute)
CR	Konservierte Region (conserved region)
CREB	Protein, dass an das cAMP-empfindliche Element bindet (cAMP responsive element binding protein)
CREF	Embryonale Rattenfibroblasten
CtBP	C-Terminus bindendes Protein (C-terminal binding protein)
Cyc	Cyclin

Da	Dalton (atomare Masseneinheit, 1 Da = 1,66 x 10 ⁻²⁴ g)
dATP	2`-Desoxyadenosin-5`-triphosphat
dCTP	2`-Desoxycytidin-5`-triphosphat
dGTP	2`-Desoxyguanosin-5`-triphosphat
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DMEM	Dulbeccos Modifikation des Zellkulturmediums von Eagle (Dulbecco`s modified Eagle`s medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	2`-Desoxyribonukleotid-5`-triphosphate
dTTP	2`-Desoxythymidin-5`-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
E1A/E1B	Frühe Region 1A/1B (early region 1A/1B)
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N`,N`-tetraessigsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (epidermal growth factor receptor)
ETF	EGFR-Transkriptionsfaktor
EtOH	Ethanol
EWS	Ewingsarkomprotein (Ewing´s sarcoma protein)
FADD	Fas-assoziierte Domäne (fas-associated death domain)
Fas/APO-1	Apoptose-vermittelndes membranassoziiertes Polypeptid
fmol	Femtomol (1 x 10 ⁻¹⁵ mol)
FKS	Fötales Kälberserum
FLI1	Friend-Leukämie Integrationsstelle 1 (Transkriptionsfaktor)
g	Gramm
G418	Geniticinsulfat
h	Stunde (hour)
Ha-Ras	Harvey Ras-Protein
HeLa-Zellen	Henrietta-Lacks-Zellen (humane Zervixkarzinomzelllinie)
HER-2	Humanes EGFR-2 Protein (human EGF receptor-2 protein)
Hsp70	Hitzeschockprotein 70 (heat shock protein 70)
IgG	Immunglobulin G
kD	Kilodalton

LB	Luria Bertania (Bakterienkulturmedium)
Lys	Lysin
M	Molar (Mol/Liter)
MeOH	Methanol
µg	Mikrogramm (10^{-6} Gramm)
µM	Mikromolar (10^{-6} mol/Liter)
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar (10^{-3} mol/Liter)
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
Neu	Neuroblastomprotein der Ratte
NF-κB	Nukleärer Faktor κB (nuclear factor κB)
nm	Nanometer (10^{-9} m)
NMRI	Naval Medical Research Institut
NRK	Normale Rattennieren (normal rat kidney)
OD	Optische Dichte
³² P	Phosphorisotop
p	Protein
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor-1
PARP	Poly(ADP-ribose) Polymerase
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCAF	p300/CBP assoziierter Faktor
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	pH-Wert ($\text{pH} = -\log_{10} [\text{Protonenkonzentration (mol/l)}]$)
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRB	Retinoblastom-Protein
Pro	Prolin
R	Aminosäurerest
RARβ	Retinsäurerezeptor-β (retinoic acid receptor-β)
RLU	Relative Luciferaseeinheit

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Svedberg-Einheit (Sedimentationskoeffizient)
S.E.M.	Standardfehler des arithmetischen Mittels
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
hSur-2	Humanes Ras-Suppressor-Protein (Suppressor of Ras)
TAE	Tris/Na-Acetat/EDTA
TAF	TBP assoziierter Faktor (TBP-associated factor)
TBP	TATA-Box bindendes Protein
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TIMP	Gewebeinhibitor der MMP (Tissue inhibitor of MMP)
TIU	Trypsininhibitor-Unit
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T _M	Schmelztemperatur
U	Unit (Einheit der Enzym-Aktivität, 1U = 1 mol/min)
uPA	Urokinase-Plasminogenaktivator
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)

1 EINLEITUNG

Die Tumorgenese ist ein Prozess, der durch eine Akkumulation genetischer Veränderungen gekennzeichnet ist, von dieser verursacht und voran getrieben wird. Eine normale Zelle hat nur eine limitierte Befähigung, sich zu teilen und besitzt eine Reihe intrinsischer Mechanismen, die zwischen Proliferation, Differenzierung und Zelltod entscheiden können. Genetische Veränderungen haben oft zur Folge, dass diese Kontrollmechanismen gestört werden und die Zelle in eine Krise treiben, die von einer ausgeprägten Neigung zum Zelltod begleitet ist. Wird der Weg des Zelltodes allerdings blockiert, kann die Zelle undefiniert proliferieren, sie wird immortal. Zusätzliche Mutationen in Tumorsuppressorgenen und zellulären Onkogenen können die Zelle vollständig maligne transformieren.

Die E1A-Proteine humanpathogener Adenoviren wurden in ihrer Rolle als virale Onkogene lange Zeit als Modellsysteme zur Aufklärung solcher Prozesse verwendet, die zur Transformation von Zellen führen (Übersicht u. a. bei Bayley und Mymryk, 1994). Seit mehreren Jahren wird aber zunehmend deutlich, dass neben den transformierenden Eigenschaften in primären Zellen E1A-Proteine in malignen Zellen tumorsupprimierende Eigenschaften haben. E1A-Proteine sind in der Lage, die Tumorigenität und das Metastasierungspotential von Tumorzellen zu supprimieren. Zudem können sie Apoptose induzieren und die Resistenz gegenüber DNA-schädigenden Substanzen revertieren (Übersicht bei Mymryk, 1996). Im Hinblick auf die immer noch unzulänglichen Therapiemethoden maligner Erkrankungen besteht ein zunehmendes Interesse am Einsatz von E1A als antineoplastisches Transgen. Dabei sollten jedoch der Nutzen, der sich aus der Tumorsuppressoraktivität von E1A ergeben könnte, und die potentiellen Gefahren, die E1A als virales Onkogen mit sich bringt, gegeneinander abgewogen werden.

1.1 Adenoviren

Adenoviren zählen zur Familie der *Adenoviridae*, die sich in die Gattungen *Aviadenovirus* (Vogel-Adenoviren) und *Mastadenovirus* (Säuger-Adenoviren) gliedern (Norrby *et al.*, 1976). Humanpathogene Adenoviren (Ad) wurden erstmalig durch Rowe (Rowe *et al.* 1953) aus chirurgisch entferntem Rachenmandelgewebe isoliert. Adenoviren verursachen beim Menschen zumeist mild verlaufende Infektionen des respiratorischen Traktes, des Gastrointestinaltraktes, der Harnwege oder des Auges (Übersicht bei Horwitz 1990). Ursprünglich wurden die humanen Adenovirus-Serotypen nach der Fähigkeit und des Ausmaßes der Tumorbildung in Nagetieren in sechs Gruppen (Subgenera A-F) eingeteilt (Horwitz, 1990). Mittlerweile untergliedert man die bisher etwa 50 identifizierten Virussubtypen hinsichtlich der Onkogenität in nicht onkogene, schwach onkogene und hoch onkogene Subtypen. Dabei liegt die Basenhomologie der Subtypen bei über 50% (Shenk, 1996).

Adenoviren besitzen keine Membranhülle, ihr Capsid ist von ikosaedrischer Form und hat einen Durchmesser von 70 - 90 nm. Das vom Capsid umschlossene Genom besteht aus einer doppelsträngigen, linearen DNA mit einer Länge von 36 - 38 Kilobasenpaaren und ist mit verschiedenen Proteinen assoziiert, die hauptsächlich für die Verpackung des Genoms verantwortlich sind (Shenk, 1996).

Die Infektion permissiver Zellen erfolgt durch die Interaktion des Fiberproteinanteils der zwölf Pentone mit Rezeptoren der Wirtszelle (Londberg-Holm und Philipson, 1969, Hennache und Boulanger, 1977). Ein bis heute beschriebener Rezeptor ist der CAR („Coxsackievirus-Adenovirus-Receptor“) (Roelvink *et al.*, 1998). Die Penetration geschieht durch rezeptorvermittelte Endozytose. Danach erfolgt das „Uncoating“ im Zytoplasma und der Transport des viralen Genoms in den Zellkern (Philipson *et al.*, 1968).

In der frühen Phase einer produktiven Adenovirusinfektion kommt es zur Bindung der viralen DNA an die nukleäre Matrix. Dieser Prozess ist für die Transkription verschiedener früher Gene der adenoviralen Transkriptionseinheiten notwendig und beginnt mit der Expression der sehr frühen Region 1A („immediate Early Region 1A“, E1A) (Schaak und Shenk, 1989). Danach folgt die Transkription der anderen frühen Transkriptionseinheiten (E2-E4), die jeweils unter der Kontrolle ihres eigenen Promotors stehen (Persson and Philipson, 1982).

Die späte Phase der produktiven Infektion erfolgt mit dem Beginn der Replikation der viralen DNA (Thomas und Mathews, 1980). Die späten Transkripte, die vorwiegend für Strukturproteine kodieren, werden in fünf Gruppen unterteilt (L1-L5) und durch einen gemeinsamen Promotor, den „major late promoter“ (MLP) reguliert (Shenk, 1996).

1.2 Die frühe Region 1A (E1A) des Adenovirus-Serotyps 5 (Ad5)

Die im linken Abschnitt des Adenovirusgenoms („map units“ 1,3-4,5) lokalisierte Region E1A kodiert für Proteine, die sehr früh während der produktiven Infektion einer Wirtszelle transkribiert werden. Bereits eine Stunde nach der Infektion ist diese Transkription detektierbar (Nevins *et al.*, 1979). Vom E1A-Gen des Adenovirus-Serotyps 5 werden nach dem Prozessieren einer heterogenen RNA fünf mRNAs durch differentielles Spleißen mit Sedimentationskoeffizienten von 13S, 12S, 11S, 10S und 9S generiert (Abb. 1; Stephens und Harlow, 1987). Die beiden vorwiegend auftretenden mRNAs sind die 13S- und die 12S-mRNA, die für Proteine mit 289 und 243 Aminosäureresten kodieren (E1A-289R- und E1A-243R-Protein), während die in geringerem Maße auftretenden Spleißprodukte zu Proteinen mit 217, 171 und 55 Aminosäureresten vorwiegend in einer späteren Phase der Infektion translatiert werden (Stephens und Harlow, 1987). Dabei wird mit Ausnahme des 55R-Proteins, das bisher nur *in vitro* nachgewiesen werden konnte, das Leseraster nicht verschoben (Abb. 1; Stephens und Harlow, 1987). Die großen E1A-Proteine, das E1A-289R- und E1A-243R-Protein, besitzen die zwischen den verschiedenen Adenovirus-Serotypen konservierten Regionen 1 (CR1) und 2 (CR2). In den Ad5 E1A-Proteinen liegt die CR1 zwischen Aminosäure 40 und 80, die CR2 zwischen Aminosäure 121 und 139. Die beiden großen E1A-Proteine unterscheiden sich durch das Fehlen der konservierten Region 3 (CR3) im E1A-243R-Protein, bei dem diese Region durch eine zusätzliche Spleißdeletion von 138 Nukleotiden zum größten Teil entfernt ist (van Ormondt, 1986). Im E1A-289R-Protein des Ad5 befindet sich die CR3 zwischen den Aminosäureresten 140-188. Alle der E1A-Region zugeschriebenen Funktionen können von einem der beiden großen Proteine ausgeführt werden.

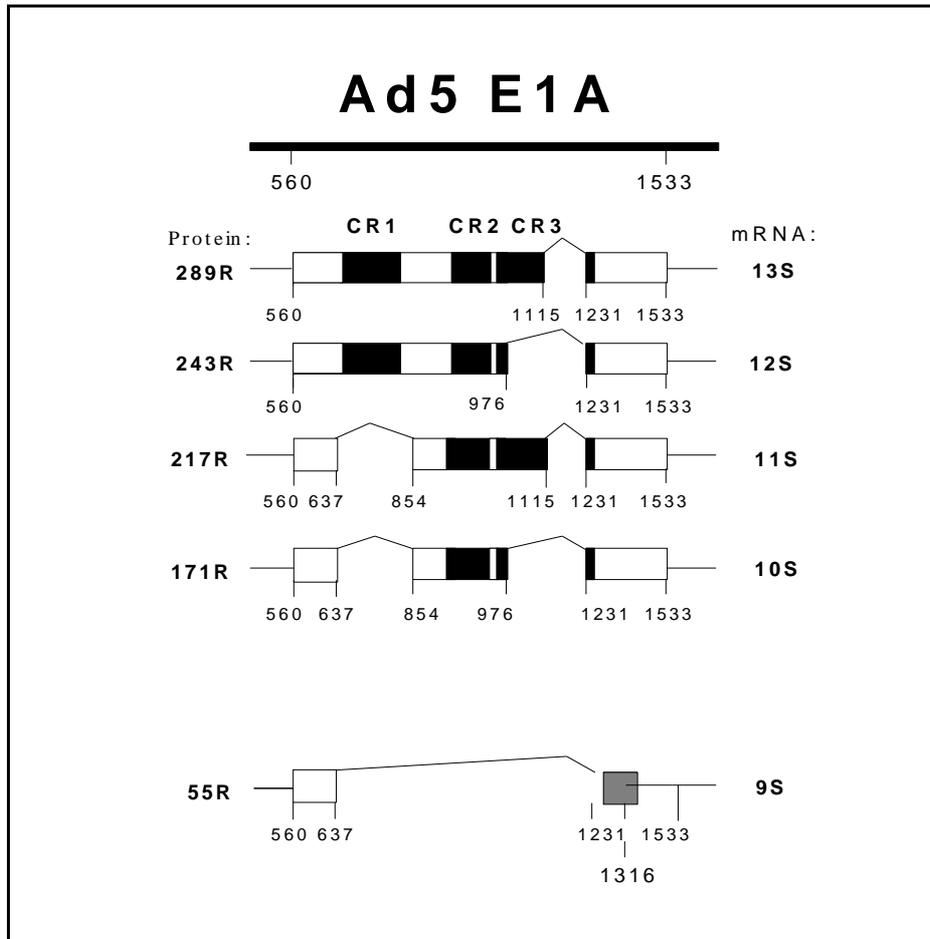


Abb. 1: Schema der Strukturen der mRNAs der Region E1A des Ad5. Die Rechtecke kennzeichnen die Protein-kodierenden Bereiche. Die schwarzen Rechtecke stellen die konservierten Regionen (CR1-CR3) dar. Die Zahlen unter den schematischen Darstellungen geben die Nukleotidpositionen im adenoviralen Genom an. R gibt die Aminosäureanzahl an. S (Svedberg-Einheit) bezeichnet die Sedimentationskonstanten der mRNAs. Das schraffierte Rechteck weist auf eine Leserasterverschiebung hin (verändert nach Brockmann und Esche, 1995).

Die E1A-Proteine sind als saure prolinreiche Phosphoproteine im Kern lokalisiert. Die nukleäre Lokalisation wird durch die Peptidsequenz KRPKP am Carboxyterminus der Proteine gewährleistet (Lyons *et al.*, 1987). Die Tatsache, dass sowohl große Deletionen als auch Insertionen außerhalb der konservierten Regionen und des Aminoterminus die biologische Aktivität der E1A-Proteine wenig beeinträchtigen, hat zu dem Schluss geführt, dass die für die E1A-Funktionen notwendigen Regionen als unabhängige Domänen fungieren können. Durch diesen modularen Aufbau ist es möglich, dass bestimmte E1A-Regionen die ihnen zugeordneten Funktionen alleine ausführen können (Lilli *et al.*, 1987).

E1A-Proteine werden durch posttranslationale Phosphorylierungen der Serinreste 89, 132, 219 und möglicherweise auch der Serinreste 96 und 231 modifiziert (Tremblay *et al.*, 1989).

E1A-Proteine kontrollieren durch Kooperation mit zellulären Transkriptionsfaktoren die Expression der anderen frühen viralen Gene (Jones und Shenk, 1979). Zusätzlich sind sie dazu befähigt, die zelluläre Genexpression zu modulieren, um damit eine für die virale Replikation optimale Umgebung in der infizierten Zelle zu schaffen. E1A-Proteine können die Transkription viraler und zellulärer Gene sowohl aktivieren als auch reprimieren (Übersicht bei Bayley und Mymryk, 1994; s. a. Kap. 1.3 und 1.4 und Abb. 2). Dabei sind sie selbst nicht in der Lage, sequenzspezifisch an DNA zu binden (Ferguson *et al.*, 1985). Ihre *transregulierende* Aktivität wird vielmehr durch die Interaktion mit anderen Proteinen vermittelt.

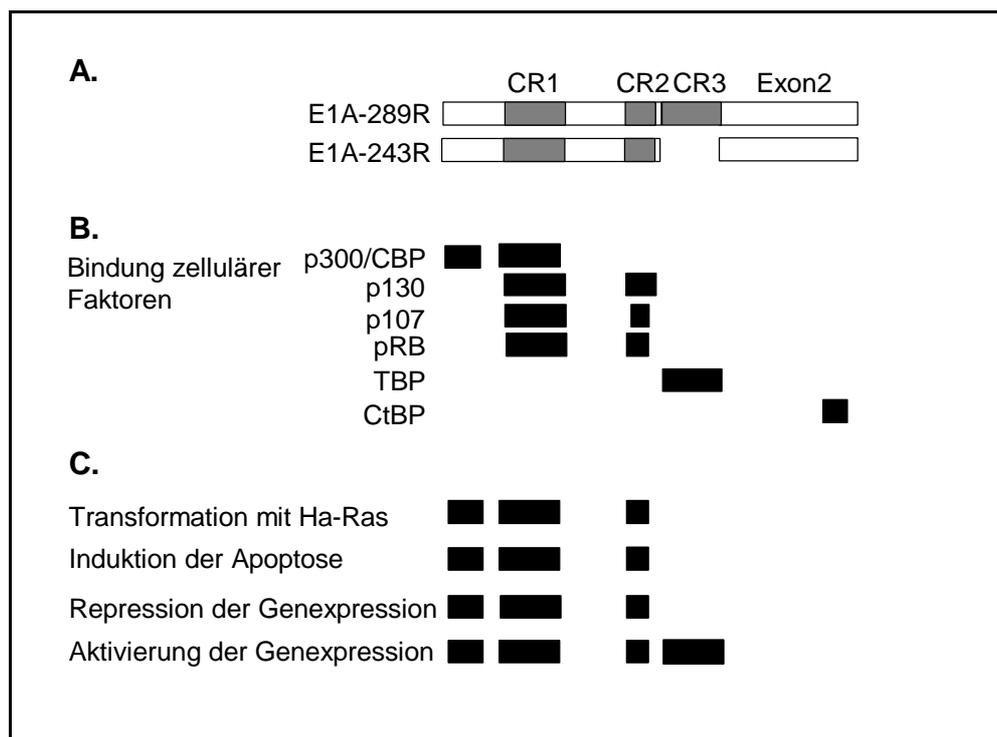


Abb. 2.: Schematische Darstellung der großen E1A-Proteine und deren funktionelle Regionen. **A.** Schematische Darstellung des E1A-289R- und des E1A-243R-Proteins mit den konservierten Regionen (CR) 1 bis 3 (schraffierte Bereiche). **B.** Schwarze Rechtecke stellen die Bindungsregionen für die jeweiligen hier aufgeführten zellulären Proteine dar. **C.** Schwarze Rechtecke symbolisieren die Regionen, die für die jeweiligen hier angeführten Funktionen der E1A-Proteine notwendig sind (verändert nach Bayley und Mymryk, 1994).

1.3 Transaktivierung viraler und zellulärer Gene durch E1A-Proteine

E1A-Proteine transaktivieren eine Reihe von Genen durch die Bindung von Faktoren, die ihrerseits die Transkription regulieren (Übersicht bei Brockmann und Esche, 1995). Die Promotoren, deren Aktivität durch die E1A-Proteine moduliert wird, zeigen häufig geringe Sequenzhomologien. Dies lässt den Schluss zu, dass E1A-Proteine sowohl mit einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren interagieren und/oder eine Reihe transaktivierender Wege anschalten können (Bayley und Mymryk, 1994).

Die CR3 alleine ist in der Lage, die Transkription von Zielgenen zu aktivieren, was durch Mikroinjektionsversuche in HeLa-Zellen gezeigt werden konnte (Lilli *et al.*, 1987). Die CR3 lässt sich in zwei funktionell unterschiedliche Domänen untergliedern. Der C-terminale Bereich mit den Aminosäureresten 183-188 kann mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren, wie z. B. ATF-2, CBF (CCAAT-binding factor) oder RAR- β interagieren und diese an einen Promotor rekrutieren (Pei und Berk, 1989). Der N-terminale Bereich mit den Resten 141-178 enthält eine Cys²His²-Zink-Finger-Domäne, die mit humanen Sur-2 (hSur-2) als Bestandteil eines humanen Mediator-Komplexes interagiert (Boyer *et al.*, 1999). Solche Mediatoren können generell die Transkription durch Bildung eines Multiprotein-Transkriptions-Initiationskomplexes mit der RNA-Polymerase II bewirken (Boyer *et al.*, 1999).

Neben der CR3 spielen auch der N-Terminus, die CR1 und die CR2 eine Rolle bei Transkriptionsaktivierung. Eine der am besten untersuchten Funktionen von E1A-Proteinen ist die Freisetzung von Mitgliedern der E2F-Familie aus dem Komplex mit den Pocketproteinen pRB, p107 und p130 (Wang *et al.*, 1991). An diese Proteine können E1A-Proteine unter Beteiligung der CR2 binden und somit die Phosphorylierung der Pocketproteine durch Cyclin-abhängige Kinasen, wie z. B. CycD/cdc4/6 funktionell mimikrieren. Die daraus resultierende Freisetzung von E2F-Faktoren führt zur transkriptionellen Aktivierung ihrer an der Regulation des Zellzyklus beteiligten Zielgene, wie z. B. DHFR, DNA-Polymerase α , PCNA oder Cyclin A (Übersicht bei Slansky und Farnham, 1996).

E1A-Proteine können die durch die AP-1-Familie der Transkriptionsfaktoren vermittelte Genexpression aktivieren. Diese Proteine, wie diejenigen der ATF- und CREB-Familie, besitzen eine bZIP-Domäne, über die sie Homo- oder Heterodimere mit spezifischen AP-1/ATF/CREB-Familienmitgliedern bilden. Beispielsweise

aktivieren E1A-Proteine den *c-jun*-Promotor vermutlich über die Interaktion und daraus resultierender Induktion einer Konformationsänderung von ATF-2, woraufhin seine aminoterminalen Transaktivierungsdomäne phosphoryliert werden kann (Sano *et al.*, 1998). Diese Funktion ist zudem von der Interaktion des N-Terminus und der CR1 mit den zellulären Kofaktoren p300/CBP abhängig (Hagmeyer *et al.*, 1993; Duyndam *et al.*, 1999). Diese beiden homologen Kofaktoren vermitteln als Brückenmoleküle den Kontakt zwischen sequenzspezifischen DNA-bindenden Faktoren und Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie (Jahnknecht und Hunter, 1996).

CtBP ist das einzige bisher identifizierte Protein, das mit einer Region des Exons 2 der E1A-Proteine, die unter verschiedenen Adenovirus-Serotypen mit den Aminosäureresten PLDLS konserviert ist, interagieren kann (Schaeper *et al.*, 1995). Es wird vermutet, dass E1A-Proteine die Transkription durch die Bindung dieses transkriptionellen Repressors dereprimieren (Sundquist *et al.*, 1998).

1.4 Transkriptionelle Repression viraler und zellulärer Gene durch E1A-Proteine

Bei der durch E1A-Proteine vermittelten transkriptionellen Repression von Genen spielen der N-Terminus und die CR1 eine entscheidende Rolle (Jelsma *et al.*, 1989; Stein *et al.*, 1990). Die Interaktion dieser E1A-Regionen mit p300/CBP führt zur Dissoziation dieser Kofaktoren von Promotor-assoziierten Komplexen und ist mittlerweile für eine ganze Reihe von Promotoren beschrieben worden, wie z. B. für den *HER2/neu*-Promotor (Chen *et al.*, 1997).

Darüber hinaus inhibieren E1A-Proteine die Histonacetyltransferase- (HAT) Aktivität von p300/CBP (Chakravarti *et al.*, 1999; Hamamori *et al.*, 1999). Die Acetylierung von Histonen spielt eine wichtige Rolle bei der Aufhebung transkriptionsreprimierender Chromatinstrukturen und ist essentiell für die Aktivierung RNA-Polymerase II-abhängiger Transkription (Struhl, 1998). Derzeit wird kontrovers diskutiert, ob E1A-Proteine auch die HAT-Aktivität von PCAF inhibieren können (Reid *et al.*, 1998; Chakravarti *et al.*, 1999; Hamamori *et al.*, 1999). PCAF wurde ursprünglich als ein CBP-bindendes Protein identifiziert und ist selbst in der Lage, die

Transkription zu aktivieren (Reid *et al.*, 1998). Durch die Interaktion mit E1A-Proteinen wird diese Aktivität reprimiert (Reid *et al.*, 1998).

1.5 Immortalisierung und Transformation durch E1A-Proteine

Die Proteinprodukte der 13S- und 12S-mRNA der E1A-Region sind abhängig vom Zelltyp in der Lage, primäre Nagerzellen *in vitro* zu immortalisieren (Houweling *et al.*, 1980; Branton *et al.*, 1985; Moran *et al.*, 1986a). Die Kooperation mit einem zweiten viralen oder zellulären Onkogen, wie z. B. E1B oder Ha-Ras, kann zur Ausbildung eines vollständig transformierten Phänotyps führen (Ruley *et al.*, 1983; van den Elsen *et al.*, 1982). Für die Transformation in Kooperation mit E1B sind Bereiche der konservierten Regionen 1 und 2 notwendig (Jelsma *et al.*, 1989; Kuppaswamy und Chinnadurai, 1987; Moran *et al.*, 1986b; Whyte *et al.*, 1988). Zusätzlich sind Bereiche des Exons 2 essentiell, wogegen für die Transformation mit Ha-Ras das Exon 2 nicht erforderlich ist (Schneider *et al.*, 1987; Subramanian *et al.*, 1989). Die benötigten Regionen sind gleichzeitig Bindungsregionen für den zellulären Kofaktor p300 (N-Terminus und CR1), bzw. für die Pocketproteine pRb, p107 und p130 (CR1 und CR2). Über die Auswirkungen der Interaktion der E1A-Proteine mit p300/CBP auf die Immortalisierung bzw. Transformation ist bisher wenig bekannt. Zumindest konnte gezeigt werden, dass die durch E1A-Proteine induzierte Repression der p53-abhängigen Zellzyklusarretierung in der G1-Phase mit der Interaktion von E1A-Proteinen mit p300/CBP korreliert (Lill *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 1997). Zudem korreliert die Dissoziation des Komplexes aus p300/CBP und PCAF durch E1A-Proteine mit dem Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus (Yang *et al.*, 1996). Die Bindung von E1A-Proteinen an die Pocketproteine bewirkt, wie ihre Phosphorylierung beim Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus, die Freisetzung aktiver E2F-Faktoren, die ihrerseits S-Phase-relevante Gene anschalten (Wang *et al.*, 1991; s. a. Kap. 1.3). Die Interaktion von E1A mit p300/CBP und/oder mit den Pocketproteinen ist daher für den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus und somit für die Immortalisierung der Zelle essentiell.

1.6 Tumorsuppression durch E1A-Proteine

Neben der schon lange bekannten Fähigkeit, primäre Nagerzellen zu immortalisieren, zeigen neuere Ergebnisse, dass E1A-Proteine zudem antionkogene Eigenschaften besitzen. Sie sind in der Lage, die Transformation primärer Zellen, die Tumorigenität und das Metastasierungspotential humaner neoplastischer Zellen zu inhibieren. Darüber hinaus induzieren E1A-Proteine die Apoptose und sensibilisieren Zellen gegenüber der Behandlung mit DNA-schädigenden Substanzen (Übersichten bei Chinnadurai, 1992 und Mymryk, 1996). Diese und andere Funktionen, die im Folgenden näher beschrieben werden, haben dazu geführt, dass man sich E1A für die Therapie maligner Erkrankungen zunutze machen möchte.

1.7 Suppression der Transformation primärer Nagerzellen durch E1A-Proteine

Einen ersten Hinweis auf die antionkogenen Eigenschaften der E1A-Proteine ergab die Beobachtung, dass die Transformation primärer Nierenzellen aus neugeborenen Ratten bei einer Infektion mit Ad5, das das E1A-243R-Protein exprimiert um ein Vielfaches effizienter war, als die Infektion mit einem Virus, das nur das E1A-289R- oder beide großen E1A-Proteine exprimiert (Haley *et al.* 1984; Montell *et al.*, 1984). Außerdem immortalisiert das E1A-243R-Protein nicht nur Fibroblasten, wie das E1A-289R-Protein, sondern auch Epithelzellen (Kuppuswamy und Chinnadurai, 1988). Dies deutet darauf hin, dass in der CR3 eine tumorsupprimierende Aktivität lokalisiert sein könnte. Die Bedeutung des Exons 2 der E1A-Proteine bei der Suppression der Transformationsfähigkeit konnte bereits demonstriert werden. So können E1A-Mutanten ohne das Exon 2 in Kooperation mit Ha-Ras viel effizienter transformieren als nicht mutierte E1A-Proteine (Subramanian *et al.*, 1989; Douglas *et al.*, 1991). Die dafür verantwortliche Region im Exon 2 mit dem konservierten Motiv PDLXL ist gleichzeitig die Bindungsregion für das CtBP (Boyd *et al.*, 1993; Schaeper *et al.*, 1995). Humanes CtBP kann mit Histondeacetylasen (HDAC), die ihrerseits die Transkription durch ihre enzymatische Aktivität an Histonen reprimieren, assoziiert vorliegen. Eine Interaktion dieser beiden Proteine führt möglicherweise zur Bildung eines Repressorkomplexes auf Promotoren (Sundquist *et al.*, 1998). Es wäre

vorstellbar, dass die Bindung des Exons 2 der E1A-Proteine an CtBP diese Interaktion verhindert und somit die repressorische Aktivität dieses Komplexes aufhebt. Dies konnte bereits für den basalen *PCNA*-Promotor gezeigt werden (Sundquist *et al.*, 1998). Zusätzlich interagiert CtBP mit einem weiteren Protein, dem CtBP-interacting-protein (CtIP), über das gleiche Bindungsmotiv wie mit E1A-Proteinen (Schaeper *et al.*, 1998). Eine Funktion von CtIP ist bisher nicht beschrieben. Es ist nicht bekannt, inwieweit die Interaktion der E1A-Proteine mit CtBP und die damit verbundene Dissoziation von CtBP/CtIP-Komplexen für die Transformation primärer Nagerzellen relevant ist.

Neben der Suppression der Transformation durch Ha-Ras, reprimieren E1A-Proteine zudem die durch das Onkoprotein *HER-2/neu* induzierte Transformation von Nagerzellen. Das *HER-2/neu*-Gen kodiert für ein 185 kDa großes Transmembranprotein, gehört zur Familie der Wachstumsfaktor-Rezeptor-Tyrosinkinase-Familie und weist eine starke Homologie zum epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) auf (Coussens *et al.*, 1985; Schechter *et al.*, 1985; Yamamoto *et al.*, 1986). Eine Punktmutation führt zur Zellzyklus-unabhängigen Kinaseaktivität und stimuliert dadurch die Proliferation (Kiyokawa *et al.*, 1995). E1A-Proteine reprimieren die Transformation durch die Interaktion mit dem transkriptionellen Kofaktor p300 und daraus resultierender transkriptioneller Suppression des *HER-2/neu*-Promotors (Chen *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1994).

Eine wichtige Rolle bei der Suppression der Transformation spielt die Regulation des Tumorsuppressorproteins p53. E1A-Proteine induzieren sowohl die Akkumulation des p53-Proteins (Braithwaite *et al.*, 1990; Lowe und Ruley, 1993) als auch die Transkription des *p53*-Gens (Braithwaite *et al.*, 1990; Hale und Braithwaite, 1999). In Zellen, die das p53-Wildtypprotein exprimieren, führt dieser Einfluss von E1A-Proteinen zur p53-induzierten Apoptose (Zambetti und Levine, 1993).

1.8 Suppression der Tumorigenität neoplastischer Zellen durch E1A-Proteine

Abgesehen von der Fähigkeit der E1A-Proteine, die Transformation primärer Zellen zu inhibieren, reduzieren sie die Tumorigenität einer Reihe von Tumorzelllinien. Untersuchungen dazu konzentrieren sich hauptsächlich auf die Suppression HER-2/*neu*-überexprimierender Tumorzellen. Es wurde hierzu gezeigt, dass die durch E1A-Proteine induzierte Suppression des *HER-2/neu*-Promotors ausreicht, um die Tumorbildung von HER-2/*neu*-überexprimierender Tumorzelllinien humaner Herkunft in immundefizienten Mäusen zu verhindern (Chang *et al.*, 1997). Weitaus weniger untersucht sind Mechanismen der HER-2/*neu*-unabhängigen Tumorsuppression. In verschiedenen Tumorzelllinien führt die Expression von E1A-Proteinen zur Ausbildung eines epithelialen Phänotyps, die mit der Reversion der Malignität dieser Zellen einhergeht (Frisch, 1991; Frisch und Dolter, 1995). Dies setzt die Hypothese voraus, dass der transformierte Zelltyp durch die Aktivierung mesenchymaler Gene entsteht (Frisch, 1997). Gleichzeitig muss es zur Repression epithelialer Gene kommen, wobei hier bereits gezeigt ist, dass in verschiedenen Tumorzellen solche Proteine schwach exprimiert werden, die für Zell-Zell-Kontakte, z. B. E-Cadherin, und die Ausbildung desmosomaler Strukturen oder zytokeratinartige intermediäre Filamente verantwortlich sind (Frisch und Francis, 1994; Frisch, 1994). Die Fähigkeit von E1A-Proteinen, in neoplastischen Zellen die Expression verschiedener epithelialer Gene zu induzieren, gibt erste Evidenzen für diese Hypothese (Frisch, 1994).

1.9 Suppression des Metastasierungspotentials neoplastischer Zellen durch E1A-Proteine

Eine Problematik bei der Behandlung fortgeschrittener maligner Tumoren stellt deren Fähigkeit zur Bildung von Metastasen dar. Interessanterweise bilden Zellen, die durch E1A-Proteine transformiert wurden, in immundefizienten Nagern keine Metastasen. Dies geht mit der Beobachtung einher, dass die Expression von E1A-Proteinen in hoch metastasierenden Zellen das metastatische Potential supprimieren können (Pozzatti *et al.*, 1986; Steeg *et al.*, 1988a und b; Frisch *et al.*, 1990; Yu *et al.*,

1992). Es sind einige Mechanismen aufgeklärt, wie E1A-Proteine in den Prozess der Metastasierung eingreifen können. Ein erster wichtiger Schritt, der bei der Bildung von Metastasen vollzogen wird, ist die Lösung einzelner Zellen aus dem Verband des soliden Primärtumors. Dabei kommt es zur Aufhebung von Zell-Zell-Kontakten, was in vielen Tumorzellen mit dem Verlust der E-Cadherin-Expression korreliert (Takeichi, 1993). So konnte in einer Rhabdomyosarkomzelllinie gezeigt werden, dass das E1A-243R-Protein die Expression von E-Cadherin induziert und dabei die Metastasierung reduziert (Frisch *et al.*, 1994). Eine weitere wichtige Voraussetzung für die Bildung von Metastasen ist die Degradierung der den Primärtumor umgebenden extrazellulären Matrix, wodurch die Auswanderung maligner Zellen ermöglicht wird. Von entscheidender Bedeutung sind hier eine Reihe von sekretierten Proteinasen, wie z. B. auch die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) (Mignatti und Rifkin, 1993). E1A-Proteine können die Expression einiger solcher MMPs (Offringa *et al.*, 1988; Frisch *et al.*, 1990) supprimieren, wobei die Mechanismen der transkriptionellen Repression teilweise aufgeklärt sind. So wird z. B. die MMP-2- (Collagenase IV) Expression durch die direkte Interaktion von E1A-Proteinen mit dem Transkriptionsfaktor AP-2 inhibiert (Bernhard *et al.*, 1995; Somasundaram *et al.*, 1996). Auf dem vom Transkriptionsfaktor AP-1 abhängigen MMP-3- (Stromelysin 1) Promotor binden E1A-Proteine den essentiellen transkriptionellen Koaktivator CBP und konkurrieren dabei mit der Bildung eines Transkriptionsfaktorkomplexes mit der c-Fos-Untereinheit von AP-1 (Offringa *et al.*, 1990; Bannister und Kouzarides, 1995). Diese beiden beschriebenen Mechanismen wirken sich möglicherweise auch auf die Expression anderer metastasierungsrelevanter Proteinase aus. Zusätzlich aktivieren E1A-Proteine die Expression der Inhibitoren der MMPs, die als „tissue inhibitors of matrix-metalloproteinasen“ (TIMPS) bezeichnet werden, wobei hier die Mechanismen weniger gut aufgeklärt sind, aber generell zur weiteren Reduktion der MMP-Aktivität führen können (Santoro *et al.*, 1994).

Auch HER-2/*neu*-transformierte Zellen werden durch die Expression von E1A-Proteinen in ihrer Fähigkeit zu metastasieren weitgehend inhibiert (Yu *et al.*, 1990, 1992). Da die Reexpression von HER-2/*neu* in E1A-exprimierenden Zellen nicht ausreicht, um die MMP-Expression zu reaktivieren (Yu *et al.*, 1993b), ist davon auszugehen, dass die direkte transkriptionelle Repression der MMPs und nicht die

des *HER-2/neu*-Promotors für die Reduktion des Metastasierungspotentials mitverantwortlich ist (Yu *et al.*, 1993b).

Die Bindung der E1A-Proteine an CtBP spielt nicht nur bei der Suppression der Transformation eine Rolle, sondern ist auch bei der Inhibition der Metastasierung wichtig. So bilden BRK-Zellen, die zusammen mit Ha-Ras und E1A-Mutanten ohne Exon 2 transformiert sind, ein stärkeres metastatisches Potential in athymischen Mäusen aus als nicht mutierte E1A-Proteine (Subramanian *et al.*, 1989; Boyd *et al.*, 1993). Die für die CtBP determinierte E1A-Bindungsregion ist ebenfalls dafür verantwortlich, dass E-Cadherin in diesen Zellen weiterhin exprimiert wird und gleichzeitig membranverankert lokalisiert ist (Gopalakrishnan und Quinlan, 1995). Daher ist zu vermuten, dass CtBP auch eine Rolle in der Regulation der E-Cadherinfunktionen spielt.

1.10 Apoptoseinduktion durch E1A-Proteine

Die Induktion von Apoptose ist von entscheidender Bedeutung für die Suppression der Onkogenese. Die beiden großen E1A-Proteine sind dazu befähigt, in einer Reihe von Zelllinien die p53-abhängige Apoptose zu induzieren. In Anwesenheit viraler E1B-Produkte, der 19 kD- und 55 kD-Proteine, wird die Apoptose inhibiert (White, 1993; Bayley und Mymryk, 1994).

Die Induktion der Apoptose durch das E1A-243R-Protein in NRK-Zelllinien benötigt die E1A-Regionen, die auch für den Eintritt in den Zellzyklus verantwortlich sind (Mymryk *et al.*, 1994). Gleichzeitig kann das E1A-243R-Protein lediglich proliferationsinhibierte Zellen in die Apoptose treiben. Möglicherweise beruht die Apoptoseinduktion mehr auf dem Konflikt zwischen der Induktion der Zellteilung und dem Proliferationsblock als auf der spezifischen Funktion des E1A-243R-Proteins (Mymryk *et al.*, 1994; s. a. Kap. 1.3).

Generell führt die Expression von E1A-Proteinen über die Suppression des Proteasomen/Ubiquitin-Abbauweges zur Stabilisierung des p53-Genprodukts (Nakajima *et al.*, 1998). In den letzten Jahren sind weitere Mechanismen aufgedeckt worden, die diesen E1A-Effekt erklären. Unter anderem ist das Tumorsuppressorprotein p19^{ARF} des INK4a-ARF-Locus in der Lage, p53 zu

stabilisieren, indem es die Mdm-2-vermittelte Degradation von p53 verhindert. Der nukleäre Export von Mdm-2 reguliert die Halbwertszeit des p53-Proteins. p19^{ARF} kann durch die Inhibition des Mdm-2-Transfers somit indirekt zur Stabilisierung von p53 beitragen (Tao und Levine, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die p53-Stabilisierung durch E1A-Proteine über p19^{ARF} vermittelt ist, da in ARF-null-Zellen diese Stabilisierung durch E1A-Proteine nicht induziert werden kann (de Stanchina *et al.*, 1998).

Neben der Fähigkeit p53 zu stabilisieren, konnte in einer neueren Arbeit gezeigt werden, dass E1A-Proteine auch für die Aktivierung des murinen p53-Promotors durch die Bindung des Transkriptionsfaktors ETF verantwortlich sind. Dazu sind beide großen E1A-Proteine notwendig (Hale und Braithwaite, 1999). Allerdings ist nicht geklärt, ob diese Ergebnisse auch auf den humanen p53-Promotor übertragbar sind.

Das E1A-289R-Protein kann auch unabhängig von p53 Apoptose induzieren. So scheint es sowohl an der Prozessierung und Aktivierung der Caspase-3 beteiligt zu sein, die als aktive Protease die Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) spaltet und somit inaktiviert. Die PARP-Spaltung ist ein frühes Ereignis in der Apoptose (Boulakia *et al.*, 1996).

E1A-Proteine aktivieren neben der Caspase-3 auch andere Mitglieder der Caspasefamilie. Bisher sind zwei grundlegende Mechanismen beschrieben worden, in denen Caspasen die Signaltransduktion des apoptotischen Zelltodes initiieren (Übersicht bei Guo und Hay, 1999). Die Bindung eines Liganden an den Zelloberflächenrezeptor Fas führt zu dessen Oligomerisierung (Kischkel *et al.*, 1995). Die Procaspase-8 oder -10 wird über das Adaptormolekül FADD an den Rezeptor rekrutiert und durch autokatalytische Prozessierung aktiviert (Kischkel *et al.*, 1995; Muzio *et al.*, 1998). Das E1A-243R-Protein induziert die Prozessierung der Caspase-8, wobei die Aktivierung aber unabhängig von der Bindung an FADD ist (Nguyen *et al.*, 1998). In einem anderen Signaltransduktionsweg wird Cytochrom-c aus den Mitochondrien freigesetzt und aktiviert zusammen mit dem Kofaktor Apaf-1 die Caspase-9 (Fearnhead *et al.*, 1998). E1A-Proteine sind sowohl an der Freisetzung von Cytochrom-c als auch unabhängig von dieser Freisetzung an der Aktivierung von Apaf-1 und Caspase-9 beteiligt (Fearnhead *et al.*, 1998).

1.11 Sensibilisierung neoplastischer Zellen gegenüber DNA-schädigenden Substanzen durch E1A-Proteine

Die Fähigkeit von E1A-Proteinen, Tumorzellen gegenüber der Behandlung mit DNA-schädigenden Substanzen zu sensibilisieren, ist von wichtiger Bedeutung für die Therapie humaner Tumoren und den möglichen Einsatz von E1A als therapeutisches Transgen.

Ein großes Problem bei der konventionellen Chemotherapie mit z. B. Cisplatin und Doxorubicin ist die Entstehung resistenter Tumorzellen bei der wiederholten Applikation dieser Substanzen. Der Mechanismus der Resistenzbildung ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Für einige kleinzellige Lungenkarzinomzelllinien (SCLC) konnte jedoch gezeigt werden, dass parakrine und autokrine Mechanismen zur ausgeprägten Bildung von Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) führen. Die Bindung von verschiedenen Integrinen an diese ECM-Bestandteile, wie z. B. Fibronectin und Laminin, aktiviert die Protein-Tyrosinkinase (PTK). Durch einen bisher unbekanntem Mechanismus wird somit die durch Zytostatika-induzierte Apoptose verhindert (Sethi *et al.*, 1999).

E1A sensibilisiert verschiedene Tumorzelllinien gegenüber der Behandlung mit 5-Fluoruracil, Etoposid, Adriamycin, Cisplatin und Doxorubicin (Lowe *et al.*, 1993; Frisch und Dolter, 1995; Sanchez-Prieto *et al.*, 1995). Bei der Sensibilisierung ist die Induktion der Apoptose durch E1A-Proteine von entscheidender Bedeutung. Dabei kann einerseits p53 aktiviert werden, aber andererseits sensibilisieren E1A-Proteine auch p53-negative Zellen für die Behandlung mit Zytostatika (Lowe *et al.*, 1993; Frisch und Dolter, 1995). Ob die Aktivierung von Caspasen dabei eine Rolle spielt (s. a. Kap. 1.10), ist bisher ungeklärt. Die Regionen der E1A-Proteine, die für die Sensibilisierung benötigt werden, sind überdies von dem Einsatz des jeweiligen Zytostatikums abhängig. So ist für die Sensibilisierung gegenüber der Cisplatinbehandlung sowohl die CR1 und CR2 essentiell, während die Sensibilisierung gegenüber der Doxorubicinbehandlung nur die CR1 benötigt (Sanchez-Prieto *et al.*, 1995).

1.12 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

E1A-Proteine besitzen neben ihren proliferationsaktivierenden Funktionen eine Reihe von tumorsupprimierenden Eigenschaften und sind somit in der Lage, die Transformation primärer Zellen, die Tumorigenität und das metastatische Potential von Tumorzelllinien zu reprimieren. Darüber hinaus induzieren E1A-Proteine p53-abhängig und -unabhängig Apoptose und sensibilisieren maligne Zellen gegenüber der Wirksamkeit von Zytostatika. Diese für einen möglichen Einsatz von E1A-Proteinen in der Therapie humaner Tumoren interessanten Fähigkeiten werden jedoch durch ihre zelltransformierenden Eigenschaften in unerwünschter Weise eingeschränkt, da es neben der Transformation primärer Nagerzellen auch Beispiele für die Transformation humaner Zellen gibt (Graham *et al.*, 1977).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob Adenovirus-Serotyp 5 E1A-Mutanten, die nicht mehr in der Lage sind, primäre Nagerzellen zu transformieren, ihre tumorsupprimierenden Eigenschaften beibehalten. Darüber hinaus war besonders die Konstruktion solcher Mutanten interessant, in denen alle für die Tumorsuppression nicht notwendigen Bereiche entfernt sind. Dabei sollte der modulare Aufbau der E1A-Proteine die Generation solcher Konstrukte erleichtern. Hintergrund einer solchen Minimierung der E1A-Proteine war zum einen die Ausschaltung solcher für die Tumorsuppression nicht essentiellen E1A-Funktionen und zum anderen der mögliche zukünftige Einsatz entsprechender Peptide in der Tumorthherapie.

Entsprechende E1A-Mutanten sollten zunächst auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, primäre Nagerzellen in Kooperation mit einem zweiten Onkogen zu transformieren.

Des Weiteren sollte die stabile Expression transformationsdefekter E1A-Mutanten in einer Tumorzelllinie Aufschluss über ihre antitumorigenen und antimetastatischen Eigenschaften geben. Um die Funktionalität der E1A-Mutanten bezüglich ihrer Tumorsuppressoreigenschaften zu untersuchen, wurde u. a. ein Modell einer hoch metastasierenden Melanomzelllinie benutzt, bei der die Expression des gesamten E1A-Gens den malignen Phänotyp revertierte und ihre Tumorigenität im Nacktmausmodell reprimierte (van Groningen *et al.*, 1996).

Zusätzlich sollte die durch die Expression der E1A-Konstrukte vermittelte Regulation der Transkription/Expression anderer Faktoren, wie z. B. p53, hTERT oder MMP, die für den Prozess der Tumorgenese von Bedeutung sind, untersucht werden.

Zudem sollte untersucht werden, ob die E1A-Mutanten in Hinblick auf mögliche Kombinationstherapien mit Zytostatika in der Lage sind, bestehende Zytostatikaresistenzen der untersuchten Zelllinien aufzuheben.

2 MATERIAL

Die hier nicht aufgeführten Chemikalien und andere Materialien wurden in p. A. Qualität von den Firmen Sigma, Merck oder Roche bezogen.

2.1 Chemikalien

Die aufgeführten Chemikalien hatten p. A.-Qualität.

Acrylamid	BioRad, München
Agarose	FMC Bioproducts, Dänemark, über Biozym, Hameln
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin (Binotal)	Bayer, Leverkusen
ATP	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Bacto Peptone	Difco, Detroit, USA
Bacto Tryptone	Difco, Detroit, USA
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
BSA	Sigma, Deisenhofen
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg
Desoxynukleotide	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Doxorubicin	Pharmacia, Freiburg
DTT	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Sigma, Deisenhofen
EGTA	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Gelatine	Merck, Darmstadt

Glutathion, reduziert	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Glycerin	Fluka, Neu-Ulm
Hepes	Merck, Darmstadt
Lithiumacetat	Sigma, Deisenhofen
Matrigel	Becton Dickinson, Bedford, USA
Methanol	Sigma, Deisenhofen
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
MOPS	Sigma, Deisenhofen
N,N`-Methylen-Bisacrylamid	Sigma, Deisenhofen
NP-40	Sigma, Deisenhofen
Platinex-Lösung	Bristol, München
PMSF	Sigma, Deisenhofen
SDS	BioRad, München
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tris	Sigma, Deisenhofen
Triton-X-100	BioRad, München
Tween-20	Sigma, Deisenhofen

2.2 Enzyme und Peptide

Alkalische Phosphatase (CIAP, 1 U/μl)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Aprotinin (Rinderlunge, 4 TIU/mg)	Sigma, Deisenhofen
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
Proteinase K	Serva, Heidelberg
Restriktionsenzyme (10 - 50 U/μl)	Life Technologies, Eggenstein Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
RNase A	Sigma, Deisenhofen
SuperScript™ II Reverse Transkriptase (200 U/μl)	Life Technologies, Eggenstein

T4 DNA Ligase (1 U/μl)	Amersham, Braunschweig
Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)	Perkin Elmer, Norwalk, USA; Sigma, Deisenhofen
Trypsin (Rinderpankreas, 110 U/ml)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

2.3 Antikörper

Anti-E1A monoklonaler Maus-IgG-Antikörper (M73, Best. Nr. sc-25)	Santa Cruz Biochemicals, Heidelberg
Anti-Hsp70 polyklonaler Ziege-Antikörper K-20, Best. Nr. sc-1060)	Santa Cruz Biochemicals, Heidelberg
Anti-Uvomorulin (E-Cadherin) monoklonaler Ratten-Antikörper (DECMA-1, Best. Nr. U3254)	Sigma, Deisenhofen
Anti-KAI 1 polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Best. Nr. sc-1087)	Santa Cruz Biochemicals, Heidelberg
Anti-Vimentin monoklonaler Maus- Antikörper (V9, Best. Nr. sc6260)	Santa Cruz Biochemicals, Heidelberg
Anti-Neu polyklonaler Kaninchen-Antikörper (C-18, Best. Nr. sc-284)	Santa Cruz Biochemicals, Heidelberg
PKA/αcat polyklonaler Kaninchen-Anitkörper (C-20)	Santa Cruz Biochemicals, Heidelberg
Anti-Maus IgG-Antikörper Peroxidase-konjugiert	Calbiochem, Heidelberg
Anti-Kaninchen IgG-Antikörper Peroxidase-konjugiert	Amersham, Braunschweig
Anti-Ziege IgG-Antikörper Peroxidase-konjugiert	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

2.4 Radiochemikalien

α -(^{32}P)-dCTP (>220 TBq/mmol bzw. 370 MBq/ml) NEN, Bad Homburg

2.5 Kits und Reagenzien

ExpressHyb TM Hybridization Solution	Clontech, Heidelberg
ExSite TM PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
Luciferase Assay System	Promega, Heidelberg
Nucleobond AX-500 Plasmid Präparations-Kit	Machery & Nagel, Düren
QIAamp Blood and Tissue Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Ready-To-Go DNA Labelling Beads	Pharmacia, Freiburg
SuperSignal ULTRA Chemiluminescent Substrate	Pierce, Rockford, USA; über KMF Laborchemie, St. Augustin
TriZOL-Reagenz	Life Technologies, Eggenstein

2.6 Molekulargewichtstandards

100 bp DNA-Ladder	Life Technologies, Eggenstein
λ -DNA-Marker	Life Technologies, Eggenstein
RNA Ladder	New England Biolabs
Full Range Rainbow Marker	Amersham, Braunschweig
Prestainend SDS-PAGE Standards, High Range	BioRad, München

2.7 Lösungen und Materialien für die Zellkultur

100 x nicht-essentielle Aminosäuren	Life Technologies, Eggenstein
DMSO	Riedel-de-Haen, Seelze
DOSPER™ Transfektionsreagenz	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Dulbecco`s Modified Eagle Medium	Life Technologies, Eggenstein
Fötale Kälberserum	PAA, Marburg
G418	PAA, Marburg
Glutamin	Merck, Darmstadt
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Penicillin G	Hoechst, Frankfurt
RPMI1640	Life Technologies, Eggenstein
Streptomycinsulfat	Sigma, Deisenhofen
Transwell-Einsätze	Becton Dickinson, New York, USA
Zellkulturschalen, -flaschen, -platten (6er-Zellkulturschalen mit 3,5 cm Ø Vertiefungen; 24er-Zellkulturschalen mit 1,5 cm Ø Vertiefungen)	Greiner GmbH, Solingen; Becton Dickinson, New York, USA

2.8 Besondere Verbrauchsmaterialien

BioRad Protein Assay	BioRad, München
Elektroporationsküvetten, 0,4 mm	BioRad, München
Sephadex G-50-Säulen	Pharmacia, Freiburg
Hybond-C-plus Blotting Membran	Amersham, Braunschweig
Hybond-N Blotting Membran	Amersham, Braunschweig
Ionenaustauscher AG 501X8	BioRad, München
Polaroidfilme	Kodak, Stuttgart
Röntgenfilme (X-omat AR5, BIOMAX)	Kodak, Stuttgart
Sterivex-GS, 0,22 µm Filter Größe	Millipore, Eschborn

Whatman-Filterpapier

Whatman, Maidstone, England

2.9 Spezielle Geräte

Bakterienschüttler G25	New Brunswick Scientific, Edison, USA
CO ₂ Begasungsinubator	Heraeus, Düsseldorf
DNA-Trio-Thermoblock für die PCR	Biometra, Göttingen
Gene Pulser II	BioRad, München
Gene Quant, DNA/RNA Calculator	Pharmacia, Freiburg
Hybridisierungssofen	Biometra, Göttingen
Laser Densitometer Ultrosan XL	LKB, Pharmacia, Freiburg
Luminometer	Berthold, Overath
Mini-Protean-II-Cell	BioRad, München
Novaspec II Photometer	Pharmacia, Freiburg
Phasenkontrastmikroskop	Leitz, Wetzlar
Ultraschalldesintegrator	Branson, USA
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München
Transilluminator (UV, 302 nm)	Bachhofer, Reutlingen

2.10 Verwendete Puffer und Lösungen

Hier nicht aufgeführte Puffer und Lösungen wurden dem Handbuch für molekularbiologische Methoden „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel *et al.*, 1997) entnommen.

Acrylamid-Lösung	29,2 g Acrylamid 0,8 g N, N'-Bisacrylamid auf 100 A. bidest (Lagerung bei 4°C)
------------------	---

Ampicillin-Lösung	50 mg/ml in A. bidest (Lagerung bei -20°C)
Aprotinin-Lösung	1 mg/ml Aprotinin 10 mM Hepes/KOH pH 7,5 (Lagerung bei -20°C)
APS-Lösung (10%)	0,1 g/ml in A. bidest (Lagerung bei -20°C)
CIAP-Puffer (10 x)	0,5 M Tris/HCl pH 8,5 1 mM EDTA 1 mM ZnCl_2 (Lagerung bei -20°C)
Zytomix (für die Elektroporation)	120 mM KCl 0,15 mM CaCl_2 10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7,6 25 mM Hepes, pH, 7,6 2 mM EGTA 5 mM MgCl_2 2 mM ATP 5 mM Glutathion 10% (v/v) FKS
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Denhardts-Lösung (100 x)	2% (w/v) BSA 2% (w/v) Ficoll 2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon (Lagerung bei -20°C)
DNA-Probenpuffer (6 x)	150 mM EDTA 0,25% (w/V) Bromphenolblau 0,25% (W/V) Xylencyanol FF 30% Glycerin

dNTP-Mix	1,25 mM dATP 1,25 mM dCTP 1,25 mM dGTP 1,25 mM dTTP in A. bidest (Lagerung bei -20°C)
E1A-Lyse-Puffer	250 mM KCl 50 mM Hepes/KOH pH 7,9 0,1% NP-40 1 mM EDTA 1 mM DTT 10 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin 10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin
Entwicklungspuffer	0,1 M Glycin/NaOH, pH 10
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml in A. bidest
First Strand-Puffer (5 x) für die reverse PCR	250 mM Tris/HCl pH 8,3 375 mM KCl 15 mM MgCl_2 (Lagerung bei -20°C)
G418-Stammlösung	400 mg/ml in A. bidest
Gelfixier-Lösung	500 ml Methanol 50 ml Eisessig auf 1 l mit A. bidest
HBS-Puffer	20 mM Hepes, pH 7,4 150 mM NaCl
Hybridisierungslösung (für den Southern Blot)	6 x SSC 5 x Denhardts-Lösung 0,5% SDS 20 $\mu\text{g/ml}$ Heringsperma-DNA

Kernextrakt-Puffer A	10 mM Hepes/KOH pH 7,9 1,5 mM MgCl ₂ 10 mM KCl 0,1 mM EDTA pH 8,0 1,0 mM DTT 0,5 mM PMSF
Kernextrakt-Puffer C	20 mM Hepes/KOH pH 7,9 1,5 mM MgCl ₂ 420 mM KCl 1,0 mM EDTA pH 8,0 1,0 mM DTT 1,0 mM PMSF 0,01 mg/ml Aprotinin 0,01 mg/ml Leupeptin 25% (v/v) Glycerin
Kollagenase-Lösung	0,1 U/ml in PBS ⁻
Laemmli-Puffer (6 x)	0,3 M Tris/HCl pH 6,8 0,6 M DTT 12% (w/v) SDS 60% (v/v) Glycerin 0,6% (w/v) Bromphenolblau
Laurylsarkosyl-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 50 mM EDTA 1% (v/v) Na-Lauryl-Sarcosyl 1 mg/ml RNase A 0,1 U/ml Proteinase K
LB-Agar	15 g Agar in 1 l LB Medium
LB-Medium	10 g Bacto-Tryptone 10 g NaCl 5 g Hefeextrakt auf 1 l mit A. bidest autoklavieren, (Lagerung bei 4°C)

Leupeptin-Stammlösung	1 mg/ml in A. bidest (Lagerung bei -20°C)
Ligase-Puffer (10 x)	0,66 M Tris/HCl pH 7,6 66 mM MgCl_2 100 mM DTT 0,66 mM ATP (Lagerung bei -20°C)
Luciferase Lyse-Puffer	25 mM Tris/HCl, pH 7,8 2 mM DTT 2 mM 1,2-diaminocyclohexan N,N,N',N'- tetraessigsäure 10% (v/v) Glycerin 1% Triton X-100
MOPS (10 x)	0,2 M MOPS 0,05 M NaAc 0,01 M EDTA pH 7,0
MTT-Stammlösung	5 mg/ml in PBS
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M Tris/HCl pH 7,2 1 mM EDTA
P1-Puffer (für die Plasmidpräparation)	50 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA 100 $\mu\text{g/ml}$ RNase A
P2-Puffer (für die Plasmidpräparation)	200 mM NaOH 1% (w/v) SDS
P3-Puffer (für die Plasmidpräparation)	3 M KAc pH 5,5
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,4 mM KH_2PO_4 6,5 mM Na_2HPO_4 0,4 mM MgSO_4 0,7 mM CaCl_2
PBS ⁻	Wie PBS, ohne MgSO_4 und CaCl_2

PCR-Reaktionspuffer (10 x)	100 mM Tris/HCl, pH 8,4 500 mM KCl 15 mM MgCl ₂ (Lagerung bei -20°C)
Penicillin/Streptomycin-Lösung	1,5 g Penicillin 2,5 g Streptomycin 2 g NaCl 0,1 g KCl 0,25 g NaHCO ₃ pH 7,2 einstellen, auf 250 ml mit A. bidest (Lagerung bei -20°C)
PMSF-Lösung	10 mg/ml in 96% Ethanol (Lagerung bei -20°C)
Renaturierungslösung	2,5% (v/v) Triton X-100 in A. bidest
RNA-Probenpuffer (5 x)	2,5% (w/v) Bromphenolblau 2,5% (w/v) Xylencyanol 1 mM EDTA 50% (v/v) Glycerin
SDS-Gelentfärber	100 ml Eisessig 125 ml Isopropanol auf 1 l mit A. bidest
SDS-Gelfärber	450 ml Methanol 450 ml A. bidest 100 ml Eisessig 2,5 g Coomassie Blue
SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,3 250 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 8,8 0,4% (w/v) SDS
SDS-PAGE-Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 6,8 0,4% (w/v) SDS

SSC (20 x)	3,0 M NaCl
	0,3 M Na ₃ -Citrat
TAE-Puffer (50 x)	2 M Tris Base
	1 M Na-Acetat
	0,1 M EDTA, pH 7,4
TBS-Blockierungspuffer	1 x TBS
	0,1% (v/v) Tween 20
	10% (w/v) Magermilchpulver
TBS-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0
	150 mM NaCl
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0
	1 mM EDTA
TFP1-Lösung	100 mM RbCl
	50 mM MnCl ₂ x 4xH ₂ O
	30 mM KAc
	10 mM CaCl ₂
	15% (v/v) Glycerin
TFP2-Lösung	10 mM MOPS
	10 mM RbCl
	100 mM CaCl ₂
	15% (v/v) Glycerin
Transferpuffer (für den Western Blot)	48 mM Tris, pH 7,5
	39 mM Glycin
	0,037% (w/v) SDS
	20% Methanol
Trypsin-Lösung	0,5 M EDTA
	2 g/l Trypsin
Zymographie-Probenpuffer (2 x)	0,125 M Tris/HCl, pH 6,8
	4% (w/v) SDS
	0,01% (w/v) Bromphenolblau
	20% (v/v) Glycerin

2.11 Bakterienstämme (*E. coli*)

DH5 α	<i>SupE44 ΔlacU169 (ϕ80lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> (Life Technologies, Eggenstein)
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdM15 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F' [traD36 proAB+ lacI^q lacZΔM15]</i> (Promega, Heidelberg)

2.12 Zelllinien

BLM	Humane Melanomzelllinie, zur Verfügung gestellt von Guido Swart, Universität Nijmegen, Niederlande (van Muijen <i>et al.</i> , 1991)
H1299	Humane nicht-kleinzellige Lungenkarzinom Zelllinie, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA (Gazdar <i>et al.</i> , 1990, Takahashi <i>et al.</i> , 1992)
293	Humane embryonale Nierenzelllinie mit Ad5 E1A und E1B transformiert, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA (Graham <i>et al.</i> , 1977)
F9	Embryonale Karzinomlinie der Maus, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA (Bernstine <i>et al.</i> , 1973)
A549	Humane Lungenkarzinom Zelllinie, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA (Girad <i>et al.</i> , 1973)
MDA-MB 361	Humane Mammakarzinom Zelllinie, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA (Cailleau <i>et al.</i> , 1978)
MDA-MB-435	Humane Mammakarzinom Zelllinie, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA (Cailleau <i>et al.</i> , 1978)
MDA-MB-231	Humane Mammakarzinom Zelllinie, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA (Cailleau <i>et al.</i> , 1978)

2.13 Vektoren

pRc-RSV	Eukaryontischer Expressionsvektor, Invitrogen, Heidelberg
pGL2	Luciferase Reporter Vektor, Promega, Heidelberg
pGL3B	Luciferase Reporter Vektor, Promega, Heidelberg

2.14 Reporterplasmide

pGL2-p53	Enthält den humanen <i>p53</i> -Gen-Promotor (Nukleotidpositionen -317 – -65)
pGL2-hsp70	Enthält den minimalen <i>hsp70</i> -Gen-Promotor (zur Verfügung gestellt von C. Svensson, Universität Upsala, Schweden)
pGL3B-TRTP	Enthält den <i>hTERT</i> -Gen-Promotor (Nukleotidpositionen -1665 - +5, zur Verfügung gestellt von I. Horikawa und J. C. Barrett, National Institute of Environmental Health Science, North Carolina, USA)

2.15 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG (Ebersberg) oder Metabion (Martinsried) hergestellt.

Name: 5` → 3`-Sequenz:

E1A-5`	ACT AAG CTT CTC CGA GCC GCT CCG ACA CCG
E1A-3`	TAC GAA TTC GGT TTA CAC CTT ATG GCC TGG GGC G
E1A-RT	GGC GTT AAC CAC ACA CGC AAT CAC AGG
P1 Mutagenese	GGT GAG GAG TTT GTG TTA GAT TAT G
P2 Mutagenese	CAC CTC CGG TAC AAG GTT TGG C
P3 Mutagenese	CAT TTT CAG TCC CGG TGT CGG
P4 Mutagenese	CCT GTG TCT GAA CCT GAG CC

3 METHODEN

Die Arbeiten mit Bakterien und Säugerzellen wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt. Die dafür notwendigen Verbrauchsmaterialien wurden vorher autoklaviert (bei 1 bar, 121°C) oder waren im Handel bereits steril erhältlich. Die verwendeten Lösungen wurden ebenfalls autoklaviert oder sterilfiltriert.

Hier nicht ausgeführte Methoden wurden dem Handbuch für molekularbiologische Methoden „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel *et al.*, 1997) entnommen.

3.1 Klonierungstechniken

3.1.1 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Bakterien

Zur Präparation kompetenter Bakterien wurden 100 ml einer frischen Übernachtskultur des *E. coli*-Stammes DH5 α bis zu einer OD_{550nm} von maximal 0,3 bei 37°C und 230 U/min in einem Schüttelinkubator vermehrt. Nach zehnminütiger Abkühlung auf Eis wurden die Bakterien bei 6000 rpm (4°C) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 32 ml TFP1-Puffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde diesmal in 8 ml TFP2-Puffer aufgenommen und 100 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die aliquotierten kompetenten Bakterien bei -70°C gelagert.

3.1.2 Transformation kompetenter *E. coli*-Bakterien

Für die Transformation wurden 1 - 10 ng Plasmid-DNA mit 100 μ l auf Eis aufgetaute kompetente *E. coli*-Bakterien gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgend wurde die mit der DNA gemischte Bakteriensuspension für 90 s bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und 2 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden auf einer

LB-Agar-Platte, die 50 - 100 µg/ml des Antibiotikums Ampicillin enthielt, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Kolonien wurden, wie unter Kap. 3.2.4 beschrieben, einem PCR-Screening unterzogen, um die Anwesenheit des Inserts zu verifizieren. Bei einem positiven Ergebnis wurde die entsprechende Kolonie in 5 ml LB-Flüssigkulturmedium mit 50 - 100 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C und 230 U/min im Schüttler angezogen, eine Glycerinstammlösung angelegt, die sich aus 80% der Übernachtskultur und 30% Glycerin zusammensetzt, und bei – 70°C aufbewahrt.

3.1.3 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Bakterien

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Bakterien basierte auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979).

3.1.3.1 Mini-Päparation

3 ml einer Übernachtskultur wurden bei 4000 g, 4°C, für 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien in 200 µl S1-Puffer resuspendiert. Dazu wurden 200 µl S2-Puffer gegeben und durch Invertieren vermischt. Nach 5minütiger Inkubation bei RT wurde kalter Puffer S3 dazugegeben, gut vermischt und nach weiteren 5 min auf Eis 10 min bei 12000 g, 4°C, zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 420 µl Isopropanol gefällt. Es erfolgte nach einer Zentrifugation bei 12000 g (30 min, 4°C) die vollständige Entfernung des Überstandes und eine Trocknung der DNA bei Raumtemperatur. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und bei 4°C gelagert.

3.1.3.2 Maxi-Präparation

Die Präparation von Plasmid-DNA aus 150 - 300 ml Übernachtskultur erfolgte mit dem Nucleobond-AX-500-Kit (Machery und Nagel) nach den Anweisungen des

Herstellers. Die aufgereinigte DNA wurde in 100 - 150 μ l A. bidest aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.1.4 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Das Schneiden von DNA erfolgte mit 1 U Enzym pro 1 μ g DNA in einem vom Hersteller bereitgestellten Puffer. Dabei war darauf zu achten, dass das Volumen des eingesetzten Enzyms 5% des Reaktionsvolumens nicht überschritt. Die Inkubationszeit betrug ca. 4 h bei 37°C .

3.1.5 Dephosphorylierung von geschnittener Plasmid-DNA

Um eine Religation geschnittener Plasmid-DNA zu verhindern, wurden mit Hilfe alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP, „Calf Intestinal Alkaline Phosphatase“, Roche Molecular Biochemicals), die am 5`-Ende gelegene Phosphatgruppe entfernt. Dazu wurde zu dem geschnittenen Plasmid 1/10 Volumen des 10 x CIAP-Puffers und 1 U der Phosphatase gegeben. Es folgte eine 30minütige Inkubation bei 37°C . Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von DNA-Probenpuffer gestoppt.

3.1.6 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Um DNA-Fragmente aufzutrennen, wurden horizontale Agarosegele in einem TAE-Puffersystem verwendet. Je nach Größe des aufzutrennenden Fragmentes wurden 0,8 - 1,2% Gele hergestellt, die mit 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid versehen waren, um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 2 - 5 V/cm^2 durchgeführt. Um die Konzentration eines DNA-Fragmentes im Gel abzuschätzen, wurde die Intensität der DNA-Bande im Gel mit einem aufgetragenen Standard verglichen.

3.1.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe eines Geextraktionskits („QIAquick Gel Extraction-Kit“, Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.1.8 Ligation von DNA mit überhängenden Enden

Zuvor geschnittene und aufgereinigte DNA-Fragmente wurden unter Verwendung einer T4-DNA-Ligase, die die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen freien 5`-Phosphatgruppen und freien 3`-Hydroxylgruppen der DNA-Moleküle katalysiert, mit einem ebenfalls geschnittenen und aufgereinigten Plasmid ligiert. Für die Ligation wurde ein molarer Überschuss des Inserts im Verhältnis 3:1 zum Plasmid eingesetzt. Der typische Ligationsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

30 fmol Vektor-DNA
90 fmol Insert-DNA
1,5 µl 10x Ligationspuffer
1 U T4-Ligase
ad 15 µl A. bidest

Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert und dann für die Transformation kompetenter *E. coli*-Bakterien eingesetzt.

3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase-chain-reaction, PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (Mullis et al., 1986) bietet die Möglichkeit, spezifische DNA-Sequenzen zu vervielfältigen, die zwischen zwei flankierenden sequenzspezifischen Oligonukleotiden liegen.

Ein typischer Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

DNA (5-3000 ng)	x µl
10 x PCR-Puffer	5 µl
dNTPs (je 1,25 mM)	8 µl
3` Primer (25 pM)	1 µl
5` Primer (25 pM)	1 µl
Taq-Polymerase (4 U/µl)	0,25 µl
A. bidest	ad 50 µl

Das Reaktionsgemisch wurde mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet und die PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung	94°C	5 min
Denaturierung	94°C	45 s
Primer-Anlagerung	$T_m - 2^\circ\text{C}$	45 s
Kettenverlängerung	72°C	90 s
Anzahl der Zyklen	25 - 40	
Abschluß-Verlängerung	72°C	7 min

3.2.1 Aufreinigung der in der PCR amplifizierten DNA

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Nach der Elution der DNA von der Silikagelsäule wurde die Konzentration des PCR-Produktes mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (s. a. Kap. 3.1.6) abgeschätzt.

3.2.2 Synthese der Ad5 13S-cDNA mittels reverser PCR

Die Ad5 13S-cDNA wurde mittels RT-PCR aus mRNA von 293-Zellen hergestellt. Es wurde 1 µg RNA in die Synthese des Erststranges eingesetzt, mit 2,5 pmol des RT-Primers vermischt und auf 12 µl Reaktionsvolumen mit A. bidest aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend für 1 min auf Eis abgekühlt. Dann wurden 4 µl des RT-Reaktionspuffers, 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM) und 2 µl DTT (0,1 M) zu dem Reaktionsansatz pipettiert und 2 min bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl Reverser Transkriptase (200 U/µl) wurde für weitere 50 min bei der gleichen Temperatur inkubiert und darauffolgend der Ansatz 15 min auf 70°C erhitzt. 2 µl des Reaktionsansatzes wurden in eine PCR zur Amplifikation der synthetisierten cDNA eingesetzt und die Größe des erhaltenen Produktes auf einem 1% Agarosegel bestimmt. Die cDNA wurde ausgeschnitten, in den pRc-RSV-Vektor kloniert und von der Firma Seqlab (Göttingen) doppelsträngig sequenziert.

3.2.3 Konstruktion der Ad5 E1A-Mutanten mittels PCR

Die Konstruktion der E1A-Mutanten wurde mit Hilfe des „ExSite™ PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kits“ (Promega) nach den Instruktionen des Herstellers vorgenommen. Dazu wurde zunächst das Ausgangsprodukt, die E1A-13S-cDNA kloniert, und dieses Konstrukt als Matrize für die PCR eingesetzt. Die Primer wurden so gewählt, dass die jeweilige vorzunehmende Deletion zwischen den 5` Enden der Primer lag. Die Bedingungen für die PCR-Reaktion wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Abschluss der PCR wurde die Matrize mit der Restriktionsendonuklease *Dpn I* geschnitten, deren Substrat nur methylierte DNA ist. Die Enden der linearen DNA wurden mit Hilfe der im Kit enthaltenen Pfu-Polymerase aufgefüllt und ligiert (s. Kap. 3.1.8). Die Doppelstrang-Sequenzierungen der Produkte wurde von der Firma Seqlab (Göttingen) durchgeführt.

3.2.4 Identifizierung Insert-positiver Bakterienklone mit Hilfe der PCR (PCR-Screening)

Um Bakterienklone mit dem gewünschten Insert zu identifizieren, wurden Bakterienklone von einer Agarplatte isoliert, in 15 µl Aqua bidest aufgenommen und resuspendiert. 10 µl dieser Suspension wurden in einem typischen PCR-Ansatz mit einem Reaktionsvolumen von 50 µl mit insertspezifischen Primern eingesetzt (s. a. Kap. 3.2). In einem 1% Agarosegel wurde die Anwesenheit und die Größe der DNA-Fragmente überprüft.

3.3 Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung von BLM-, H1299-, 293-, A549-, MDA-MB-435-, MDA-MB-361-, MDA-MB-231- und BMK-Zellen erfolgte auf beschichteten Zellkulturflaschen oder –schalen in einem Brutschrank bei 37°C in einer 7,5% CO₂-Atmosphäre. H1299-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium, alle übrigen Zellen in DMEM-Medium gehalten. Den Medien wurden 10% fötales Kälberserum (FKS), 0,03 M L-Glutamin, nichtessentielle Aminosäuren und je 100 µg/ml Streptomycin und Penicillin zugesetzt. Kurz vor Erreichen der Konfluenz wurden die adhärennten Zellen mit PBS⁻ gewaschen, mit einer Trypsin-Lösung vom Boden der Zellkulturgefäße abgelöst, in frischem Medium aufgenommen und resuspendiert. Die Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:10 bis 1:15 in neue Zellkulturgefäße überführt. Zur Konservierung von Zellen wurden nicht konfluent gewachsene Zellen wie beschrieben von dem Zellkulturgefäß abgelöst und in 2 ml Einfriermedium aufgenommen und resuspendiert. Die Suspension wurde in Kryoröhrchen überführt, diese dann mit Zellstoff umwickelt und über Nacht bei –70°C eingefroren. Anschließend wurden sie in flüssigem Stickstoff bei –180°C gelagert.

3.3.1 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen wie oben beschrieben von dem Zellkulturgefäß abgelöst, in frischem Medium aufgenommen und suspendiert. Ein Aliquot wurde im Verhältnis 1:2 mit einer Eosinlösung vermischt und die vitalen Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

3.3.2 Präparation primärer Mausnierenzellen

Aus 3 - 7 Tage alten Mäusen (NMRI Stamm) wurden Nieren präpariert und diese mechanisch zerkleinert. Nachfolgend wurden die Gewebestücke über einen Zeitraum von 2 h in einer Kollagenase-Lösung (0,1 U/ml) bei 37°C unter Rühren inkubiert. Die aus dem Gewebeverband ausgelösten Zellen wurden in Zellkulturschalen kultiviert und spätestens nach der zweiten Passage zur Transfektion verwendet.

3.4 Transfektion von Zellen

Um fremde DNA in Zellen zu transfizieren, wurde entweder die Methode der Elektroporation oder die Lipofektion angewandt.

3.4.1 Elektroporation

Diese Methode wurde für die Herstellung stabiler Zelllinien und für den Expressionsnachweis verschiedener Proteine angewandt.

Um Zellen für die Transfektion zu erhalten, wurden diese mit 37°C warmen PBS⁻ gewaschen, trypsiniert und in PBS⁻ aufgenommen. Die Zellzahl wurde bestimmt und die Zellsuspension (1500 rpm, 4°C, 10 min) zentrifugiert. Durch Zugabe von Zytomix wurden eine Zellzahl von 3×10^7 Zellen/ml Lösung eingestellt. In einer Elektroporationsküvette (BioRad) wurden 20 µg der zu transfizierenden DNA in

einem Volumen von 25 μl vorgelegt und mit 225 μl ($6,65 \times 10^7$ Zellen) der Zellsuspension vermischt. Die Küvette wurde für 10 min auf Eis inkubiert, danach erfolgte die Elektroporation unter optimalen Bedingungen. Bei den BLM-Zellen wurde eine Spannung von 250 V bei einer Kapazität von 975 μF angelegt. Für die H1299-Zellen wurde die gleiche Spannung bei einer Kapazität von 500 μF zur Elektroporation verwendet. Die Zellen wurden danach wiederum 10 min auf Eis inkubiert und anschließend auf 10 cm Kulturschalen mit Vollmedium ausgesät und kultiviert. 24 h nach der Transfektion wurde das Medium erneuert und die Zellen 48 h nach der Transfektion geerntet oder weiterhin kultiviert.

3.4.2 Lipofektion

Für die Transfektion mit DOSPER (Boehringer, Mannheim) wurden am Tag zuvor 1×10^5 Zellen je Vertiefung in 6er-Zellkulturplatten in 2 ml Vollmedium ausgesät. 1 h vor der Transfektion wurde das Medium durch 1 ml frisches Medium mit einem FKS-Gehalt von 7,5% ersetzt. In Reagenzgefäßen wurden 0,3 - 1 μg eines Reporterplasmids und 0,02 - 0,3 μg eines Expressionsplasmids auf 50 μl Volumen mit HBS-Puffer verdünnt. In einem anderen Reaktionsgefäß wurden 4 μl DOSPER mit 46 μl HBS-Puffer verdünnt. Diese Lösung wurde zu der DNA-Lösung pipettiert und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde das Gemisch unter leichter Bewegung der Zellkulturplatte auf die Zellen pipettiert. Am Tag nach der Transfektion wurde das Medium durch 2 ml frisches Vollmedium ersetzt.

3.5 Koloniebildung G418-resistenter Zellen

Es wurden 1×10^5 Zellen in Vertiefungen einer 6er-Zellkulturplatte ausgesät und über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden mit den entsprechenden Plasmiden mit DOSPER transfiziert und 24 h nach Beendigung der Transfektion die Zellen auf eine größere Zellkulturschale überführt. 48 h nach Beendigung der Transfektion wurde mit der Selektion begonnen. Dafür wurde dem Medium eine zuvor ausgetestete Menge des Antibiotikums G418 zugesetzt. Die Zellen wurden 2 - 3 Wochen bis zur Ausbildung

von Zellklonen unter Selektionsbedingungen gehalten. Danach wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS⁻ gewaschen und 10 min in einer Giemsalösung gefärbt. Die überschüssige Färbelösung wurde entfernt und die Schalen mit A. bidest gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die Anzahl der sichtbaren Zellklone bestimmt.

3.6 Herstellung stabiler E1A-exprimierender Zelllinien

Die Zellen wurden mit dem entsprechenden Plasmid mittels Elektroporation transfiziert. 48 Stunden nach Ende der Transfektion wurde dem Medium das Antibiotikum G418 zugesetzt, gegen das bei Anwesenheit des gewünschten Plasmids ein Resistenzgen exprimiert wird. Die Konzentration von G418 wurde so gewählt, dass untransfizierte Zellen nach einem Zeitraum von einer Woche absterben. Das Selektionsmedium wurde zweimal wöchentlich erneuert und so lange eingesetzt bis sich Zellklone auf der Zellkulturschale ausbildeten. Diese wurden mit Klonierungsringen vereinzelt und in kleineren Zellkulturschalen weiterhin unter selektiven Bedingungen gehalten. Von den Zellen wurden Proteinextrakte hergestellt und die E1A-Expression Western-Blot-Verfahren überprüft (s. Kap. 3.8.5). Gegebenenfalls wurde zusätzlich DNA aus den Zellen isoliert und die Unabhängigkeit der Integration des Plasmids im Southern-Blot-Verfahren überprüft (s. Kap. 3.7.7).

3.7 Kultivierung von Zellen im Weichagar

Zur Herstellung der Basalschicht wurde eine 1,2% Agarlösung (w/v) auf 45°C erhitzt und im gleichen Verhältnis mit 37°C warmem doppelt konzentriertem DMEM (BLM-Zellen) oder RPMI 1640 (H1299-Zellen) mit einem FKS-Gehalt von 25% gemischt und dann zügig und luftblasenfrei jeweils 1 ml in eine Vertiefung einer 6er-Zellkulturplatte pipettiert. Bis zum Erkalten des Agars wurde die Platte bei Raumtemperatur gelagert. Für die Testschicht wurde eine 0,6% Agarlösung hergestellt, die ebenfalls vor der Verwendung auf eine Temperatur von 45°C

gebracht wurde. Die Zellen, die im Weichagartest eingesetzt werden sollten, wurden in doppelt konzentriertem Medium (25% FKS) verdünnt, so dass sie in einer Konzentration von 6000, 8000 oder 10000 Zellen pro 0,5 ml Medium vorlagen. Die Zellsuspensionen wurden zu gleichen Teilen mit der 0,6% Agarlösung vermischt und 1 ml dieses Gemisches luftblasenfrei auf die Basalschicht gegeben. Die Weichagarplatten wurden bis zum Erstarren der Testschicht bei RT und dann im Brutschrank bei 37°C, 7,5% CO₂-Atmosphäre inkubiert.

Nach ca. 3 Wochen wurde die Anzahl der gewachsenen Zellkolonien unter dem Lichtmikroskop bestimmt, wobei nur Klone mit einem Durchmesser von über 1 µm gezählt wurden.

3.8 Aufreinigung von Nukleinsäuren

3.8.1 Präparation genomischer DNA aus Eukaryontenzellen und Tumorgewebe

Zur Präparation genomischer DNA adhärenter Kulturzellen wurden $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Zellen mit PBS⁻ gewaschen und mit einem Zellschaber von der Zellkulturplatte abgelöst. Sie wurden bei 1500 rpm, 4°C, 10 min abzentrifugiert und die DNA mit dem „QIAamp Tissue Kit“ (Qiagen) nach dem Protokoll für die Extraktion von DNA aus Zellen nach den Angaben des Herstellers gewonnen und bei -20°C gelagert. Die genomische DNA aus Gewebepulver wurde mit dem Gewebeprotokoll des gleichen Kits präpariert. Dazu wurde 50 mg Gewebepulver eingesetzt.

3.8.2 DNA-Quantifizierung

Die Quantifizierung und Beurteilung der Qualität der DNA erfolgte durch photometrische Messung der Extinktion bei 260 nm und 280 nm. Die Extinktion_{260nm} = 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Der Quotient aus 280/260 nm, der optimalerweise bei 1,8 liegen sollte, gibt die Reinheit der DNA an.

3.8.3 Präparation von RNA

Die Isolierung der RNA aus Zellen erfolgte mit „TRIzol-Reagenz“ (Gibco BRL, Life Technologies) nach Anleitung des Herstellers. Dieses Präparationskit basiert auf der „single Step“-Methode von Chomczynski und Sacchi (1987), nach der die RNA durch alkoholische Fällung nach Inaktivierung von RNasen durch Guanidinthiocyanat und Abtrennung von DNA und Proteinen mit saurem Phenol präzipitiert wird. Für die Präparation wurden 1×10^7 Zellen gewonnen und in 1 ml TRIzol-Reagenz lysiert. Nach Präzipitation und Fällung der RNA wurde sie bei Raumtemperatur getrocknet und in 30 µl RNase-freiem A. bidest aufgenommen und bei -70°C aufbewahrt.

3.8.4 Quantifizierung der RNA

Die Quantifizierung der RNA erfolgte wie die der DNA durch photometrische Messung. Eine Extinktion_{260nm} von 1 entspricht einer RNA Konzentration von 40 µg/ml. Bei einem Verhältnis 260 nm/280 nm gleich 2 liegt die RNA ohne Verunreinigungen vor.

3.8.5 Überprüfung der RNA-Qualität

Da die Quantifizierung nur in beschränktem Maße über die Reinheit der RNA Aufschluss gibt, wurde eine zusätzliche Überprüfung mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese vorgenommen. Dabei wurde 1 ml der Probe hitzedenaturiert und in einem 0,7% Agarosegel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt. Unter UV-Licht-Bestrahlung sind die 28S-rRNA, die 18S-rRNA und die 5S-rRNA als Hauptbestandteile der zellulären RNA zu erkennen.

3.9 Northern-Blotting

Zur Hybridisierung mit genspezifischen Sonden wurde die RNA unter denaturierenden Bedingungen (1,2% Agarose, 1 x MOPS, 0,66 M Formaldehyd) elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend durch Kapillartransfer auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham) übertragen (Fourney *et al.*, 1988). Der Transfer erfolgte über einen Zeitraum von 14 - 16 h. Nach abgeschlossenem Transfer wurde die Membran zur Fixierung der transferierten RNA 2 - 3 min mit UV-Licht (302 nm) bestrahlt. Zur Überprüfung des Transfers wurde die Membran nach Ansäuern mit 10% Essigsäure kurz in einer Färbelösung (0,5 M Natriumacetat, 0,04% Methylenblau) geschwenkt (Herrin und Schmidt, 1988). Bei einem erfolgreichen Transfer war nach Abspülen der überschüssigen Färbelösung die 28S-rRNA und die 18S-rRNA zu erkennen. Damit wurde gleichzeitig sichergestellt, dass gleiche RNA-Mengen auf die Membran transferiert wurden.

3.10 Southern-Blotting (Southern, 1975)

Zum Nachweis der Integration bestimmter DNA-Sequenzen in das Genom von Zellen wurde die mit der Restriktionsendonuklease *Bgl II* geschnittene genomische DNA zunächst in einem 1% Agarosegel bei einer Spannung von 40 V elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde das Gel 1 h bei RT in einer Denaturierungslösung, die

jeweils nach 15 min erneuert wurde, inkubiert. Um große DNA-Fragmente für den Transfer zu hydrolysieren wurde das Gel anschließend für 15 min in eine 0,25 M HCl-Lösung gebracht und dann 90 min in einer Neutralisierungslösung mit dreifachem Wechsel der Lösung belassen. Mittels Kapillartransfer in 20 x SSC wurde die aufgetrennte DNA über Nacht auf eine Nylonmembran transferiert und durch eine 5minütige UV-Bestrahlung (302 nm) fixiert.

3.11 cDNA-Sonden für die Hybridisierung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden komplementäre DNA- (cDNA) Sequenzen zur Hybridisierung genutzt. Die E1A-Sonde stammte aus der Klonierung der 13S-cDNA (Kap. 3.2.2). Die uPA- und PAI1-cDNA wurde freundlicherweise von Guido Swart, Universität Nijmegen (Niederlande), zur Verfügung gestellt.

3.12 Radioaktive Markierung von DNA

Zur radioaktiven Markierung wurde der „DNA labelling beads“-Kit (Pharmacia) verwendet. Dazu wurden 50 ng der zu markierenden DNA in einem Volumen von 45 µl TE-Puffer 5 min hitzedenaturiert und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wurde die DNA-Lösung zu dem bereitgestellten Markierungsmix gegeben und vermischt. Anschließend wurden 5 µl (10 mCi/ml) radioaktiv markierter $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTPs hinzupipettiert und 15 - 30 min bei 37°C inkubiert. Die freien Radionukleotide wurden über eine Sephadex-G50-Säule von der markierten DNA abgetrennt und diese bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

3.13 Hybridisierung von RNA

Zum Nachweis spezifischer RNA wurde die auf der Nylonmembran immobilisierte RNA mit der entsprechenden ^{32}P -markierten cDNA hybridisiert. Die Membran wurde

zunächst 30 min in einer Hybridisierungslösung (ExpressHyb, Clontech Laboratories) bei 68°C in einem Hybridisierungsinkubator prähybridisiert. Nach der Hitzedenaturierung der entsprechenden Sonde für 5 min bei 100°C wurde sie in einer Endkonzentration von $1 - 2 \times 10^6$ cpm/ml zur Prähybridisierungslösung gegeben und für 1 h bei 68°C hybridisiert. Nach mehreren Waschschrinen (mehrfach 2 x SSC, 0,05% SDS, RT; 2 x 20 min, 0,1 x SSC, 0,1% SDS, 50°C) wurde die Membran luftblasenfrei in Klarsichtfolie eingeschlagen und die auf der Membran spezifisch gebundene Radioaktivität mit einem Röntgenfilm (Kodak, Biomax) autoradiographisch in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie detektiert. Nach der Dehybridisierung in 0,5% SDS Lösung bei 100°C, in der die Membran zweimal für 20 min bis zur Abkühlung der Lösung geschüttelt wurde, konnte die Membran wiederholt hybridisiert werden.

3.14 Hybridisierung von DNA

Die Hybridisierung auf der Nylonmembran immobilisierter DNA mit einer ^{32}P -markierten Sonde erfolgte bei 65°C für 12 h in einer Hybridisierungslösung, der eine radioaktiv markierte, denaturierte Sonde mit einer spezifischen Aktivität von $1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ cpm/ μg zugesetzt war. Die Konzentration der Sonde in der Hybridisierungslösung entsprach dabei $1 - 2 \times 10^6$ cpm/ml. Zuvor wurde die Membran 1 h bei gleicher Temperatur ohne Zusatz der Sonde unter Verwendung der gleichen Lösung prähybridisiert. Danach wurde die Membran folgenden Waschschrinen bei 65°C unterzogen:

2 x 15 min mit 2 x SSC

1 x 30 min mit 2 x SSC; 0,1% SDS

1 x 10 min mit 0,1 x SSC

Nach dem letzten Waschschrin wurde die Membran in Klarsichtfolie luftblasenfrei eingeschlagen und die gebundene Radioaktivität mit einem Röntgenfilm in einer Expositionskassette mit Verstärkerfolie detektiert.

3.15 Proteinchemische Methoden

3.15.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Eukaryontenzellen

Die Zellen wurden auf einer maximal 70% konfluent gewachsenen Zellkulturschale mit PBS[±] gewaschen, mit einem Zellschaber in PBS[±] abgelöst und bei 1500 rpm, 4°C, 10 min abzentrifugiert. Für den Nachweis der Expression von E1A-Proteinen in Zellen, wurden diese dann 30 min mit E1A-Lysepuffer oder alternativ mit einem CHAPS-Puffer, wenn speziell Zellmembran-assoziierte Proteine extrahiert werden sollten, auf Eis inkubiert und danach bei 4°C 15 min geschüttelt. Alle nicht löslichen Zellbestandteile wurden bei 28000 rpm, 4°C, 20 min sedimentiert. Zum Nachweis der Expression kernlokalisierter Proteine wurden die abzentrifugierten Zellen in Puffer A resuspendiert und 10 min auf Eis belassen, danach wurde 1/10 Volumen NP-40 untergemischt und die freigesetzten Kerne sofort bei 8000 rpm 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde aufgehoben und die Kerne in Puffer C resuspendiert. Nach 15minütiger Inkubationszeit bei 4°C unter Schütteln wurden die Extrakte zentrifugiert (28000 rpm, 4°C) und mit dem Überstand des ersten Zentrifugationsschrittes vereinigt. Proteinextrakte wurden grundsätzlich aliquotiert bei -70°C aufbewahrt.

3.15.2 Herstellung von Proteinextrakten aus Tumorgewebe

Ein Aliquot des hergestellten Gewebepulvers (s. Kap. 3.18.3) wurde in E1A-Lysepuffer in einem Glas-Glas-Homogenisator homogenisiert und dann 1 h bei 4°C geschüttelt. Nicht gelöste Bestandteile wurden für maximal 5 s beschallt und das Homogenat für 10 min bei 4°C und 20000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.15.3 Proteinquantifizierung

Die Bestimmung des Proteingehaltes einer Lösung erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Zu 1 - 5 µl einer Proteinlösung wurden 200 µl Bradford-Reagenz (BioRad) gegeben und auf 1 ml mit A. bidest aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration bei einer Wellenlänge von 595 nm mit Hilfe einer zuvor aufgestellten BSA-Eichkurve.

3.15.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde das Verfahren der denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem diskontinuierlichen Puffersystem (Laemmli, 1970) angewandt. Die Zusammensetzung und Herstellung des Sammel- und Trenngels wurde der Methodensammlung „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel *et. al.*, 1997) entnommen. Die verwendeten Trenngele hatten je nach Bedarf einen Acrylamid-Gehalt von 7,5% - 15%. Die Proteine wurden in SDS-Probenpuffer zur Denaturierung 5 min aufgekocht und dann auf das Gel geladen. Die Elektrophorese wurde zunächst für ca. 15 min bei 70 V und dann bei 150 V durchgeführt. Nach dem Gellauf wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel mit den aufgetrennten Proteinen geblottet.

3.15.5 Western-Blotting (Harlow und Lane, 1988)

Zum Nachweis spezifischer Proteine wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose Membran (Hybond C+, Amersham) transferiert. Das Gel und eine Nitrozellulosemembran gleicher Größe wurden dazu zunächst in einem Transferpuffer für 10 min equilibriert und die Proteine in einer „Semi-dry-Blotting“-Apparatur (Biorad) bei einer Stromstärke von 70 mA 1 h auf die Membran transferiert. Nach dem Trocknen wurde die Membran mit einem TBS-Blockierungspuffer (1 x TBS, 0,1% Tween 20, 10% Milchpulver) unter leichtem

Schütteln bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Blockierungspuffer wurde entfernt und ein spezifischer 1. Antikörper in Blockierungspuffer zugegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 1 h bei RT unter Schütteln wurde die Membran 1 x 15 min und 3 x 5 min in 1 x TBS, 0,1% Tween 20 gewaschen und mit einem spezifischen Meerrettich-Peroxidase-konjugierten 2. Antikörper 30 min in einer Lösung bestehend aus 1 x TBS, 0,1% Tween 20, 0,5% Milchpulver in entsprechender Verdünnung inkubiert. Danach folgten weitere Waschschrte:

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

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

1 x 5 min 1 x TBS, 0,2% Tween 20

1 x 5 min 1 x TBS

Die Detektion der Peroxidase-Aktivität erfolgte mit dem „SuperSignal ULTRA Chemiluminescent Substrate“ (Pierce) nach den Angaben des Herstellers. Je nach Intensität der Chemilumineszenz wurden die Röntgenfilme 5 s bis 30 min exponiert.

3.15.6 Zymographie

Die Zymographie dient dem Nachweis matrixdegradierender Enzyme aus Zellen nach der elektrophoretischen Auftrennung in einer geeigneten Matrix. Zur Gewinnung des Probenmaterials wurden 2×10^4 Zellen in eine Vertiefung einer 96er-Zellkulturplatte gegeben und die Zellen über Nacht bei 37°C, 7,5% CO₂-Atmosphäre in 100 µl Vollmedium inkubiert. Danach wurde das Medium durch 40 µl serumfreies Medium ersetzt und die Zellen weitere 24 h kultiviert. Das Medium wurde abgenommen und bis zum Einsatz in die Zymographie bei -70°C gelagert. Als Kontrolle für die Aktivität von Proteasen im fötalen Kälberserum wurde in der Zymographie nicht konditioniertes Vollmedium und zusätzlich serumfreies Medium, das aus einer Kulturplatte entnommen wurde, in der sich zuvor Vollmedium befunden hatte, eingesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Zymogramme von Proteasen in denaturierenden Polyacrylamidgelen unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgenommen. Dazu wurde die im Überstand befindlichen Proteasen mit 1 x Zymographie-Probenpuffer

15 min bei RT inkubiert und danach in einem SDS-PA Gel, das 0,1% Gelatine enthielt, mit einer Stromstärke von 10 mA bei 4°C elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel 30 min vorsichtig in einer Renaturierungslösung mit einmaligem Austausch der Lösung geschüttelt. Der Puffer wurde durch einen Entwicklungspuffer ersetzt, in dem das Gel für 12 - 16 h bei 37°C geschüttelt wurde. Danach wurde das Gel fixiert und mit Coomassie gefärbt. Die proteolytische Aktivität war in Form von durchsichtigen Bereichen in einem blau gefärbten Gel zu erkennen.

3.16 Invasionsversuche

Eine 24er-Zellkulturplatte wurde mit dafür vorgesehenen Transwell-Einsätzen mit einer Porengröße von 8 µm bestückt und diese mit einer Matrixbeschichtung versehen. Dazu wurde Matrigel (Becton Dickinson, USA) 1:20 mit eiskaltem serumfreien Medium verdünnt und je 100 µl auf die Membranen pipettiert und dieses über Nacht bei RT unter sterilen Bedingungen getrocknet. Vor dem Aussäen der Zellen wurde die Membran mit 100 µl serumfreien Medium bei 37°C 1 h rekonstituiert und das Medium anschließend wieder entfernt. Es wurden 4×10^4 Zellen je matrixbeschichteten Transwell-Einsatz in 200 µl Vollmedium ausgesät und in die darunter befindliche Vertiefung der Zellkulturplatte je 800 µl Vollmedium gegeben. Nach einem Kultivierungszeitraum von 24 h wurden die durch die Membran hindurch gewanderten Zellen 2 x 5 min in PBS[±] gewaschen und 10 min mit eiskaltem Methanol fixiert. Die Zellen, die sich noch auf der Oberseite der Membran befanden, wurden zuvor mit einem Wattestäbchen vorsichtig entfernt. Danach wurden die Zellen in A. bidest gewaschen und 5 min einer Hämatoxylin-Färbung unterzogen. Die überschüssige Farbe wurde durch 10 min Waschen in A. bidest entfernt und anschließend die Zellen 2 min in Eosin gefärbt. Nach weiteren Waschschritten wurde die Membran aus dem Einsatz mit einem Skalpell herausgeschnitten und mit der Unterseite nach oben auf einen Objektträger gebracht. Die Membran wurde mit 90% Glycerin eingedeckt. Unter dem Lichtmikroskop wurde die Anzahl der durch die Membran gewanderten Zellen analysiert. Parallel wurden die gleiche Zahl von Zellen in 96er-Zellkulturplatten ausgesät und nach 24stündiger Kultivierung die Zellzahl

bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden für die Normierung der invadierten Zellen verwendet.

3.17 Bestimmung der Luciferase-Reporter-Gen-Aktivität in Zellextrakten

Um die Aktivierung von Promotoren bestimmter Gene durch die Expression der E1A-Konstrukte zu untersuchen, wurden die vor ein Luciferase-Reporter-Gen-Plasmid klonierten zu untersuchenden Promotoren mit den entsprechenden E1A-Plasmiden wie unter Kap 3.4.2 beschrieben kotransfiziert. Die Aktivität des Luciferase-Reporters ist dabei ein Maß für die transaktivierenden Eigenschaften des jeweiligen E1A-Konstruktes.

48 h nach Beginn der Transfektion wurden die Zellen einmal in PBS⁻ gewaschen und 100 µl des Luciferase-Lyse-Puffer direkt auf die in den Zellkulturgefäßen befindlichen Zellen gegeben und 10 min bei RT belassen. Die Zellen wurden dann mit einem Gummischaber geerntet und bei 22000 x g 10 min, 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Durchführung der Messung der Luciferase-Aktivität bei -80°C gelagert.

Für die Messung wurden 20 µl des Extraktes bei RT in ein Luciferase-Röhrchen vorgelegt und die Messung in einem Luminometer vorgenommen. Von dem Gerät werden automatisch je 100 µl des Assay-Reagenz (Promega) in die Röhrchen eingebracht. Dabei werden die bei der Oxidation des Luciferin durch Luciferyl-CoA freigesetzten Photonen gemessen und als RLU (relative Luciferaseeinheit) angegeben. Parallel wurde die Proteinkonzentration der Extrakte gemessen. Falls es zu unterschiedlichen Proteinausbeuten kam, wurden die erhaltenen Luciferaseeinheiten entsprechend korrigiert.

3.18 Tierversuche

3.18.1 Haltungsbedingungen

Die nu/nu Mäuse (NMRI Stamm) entstammten einer Zuchtkolonie der Nagerabteilung des Zentralen Tierlabors und wurden auch während der Versuche dort unter halbsterilen Bedingungen bei einem täglichen Licht-Dunkel-Wechsel von 12:12 gehalten. Den Tieren stand zu jeder Zeit Standard-Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung.

3.18.2 Xenotransplantate

Die verwendeten Tiere hatten zu Versuchsbeginn ein Alter von 6-8 Wochen. Ihnen wurden entweder 3×10^6 Zellen der BLM-Zelllinien oder 1×10^7 Zellen der H1299-Zelllinien je in einem Volumen von 0,2 ml entweder in die Vorderlaufbeuge oder in die Flanke mit einer Insulinspritze subkutan appliziert. Für jede untersuchte Zelllinie wurden mindestens 3 Tiere verwendet. Bei der Bildung eines Tumors wurde dieser je nach Wachstumsgeschwindigkeit dreimal wöchentlich mit einer Schieblehre vermessen und dabei die Länge und Breite bestimmt. Die Tumore wurden, wenn sie die Bewegungsfreiheit der Tiere nicht einschränkten, maximal bis zu einer Größe von 1,5 cm wachsen gelassen. Die Berechnung des Tumolvolumens erfolgte nach der Formel $V = (a \times b^2)/2$, wobei a = Länge und b = Breite des Tumors als Größen eingesetzt werden (Sanchez et al., 1994). Die Formel gibt eine Näherung des Tumolvolumens bei gemessener Fläche wieder.

3.18.3 Aufarbeitung des Tumorgewebes

Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet und möglichst das komplette Tumorgewebe entnommen, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -70°C gelagert. Zur Aufarbeitung wurde in einem in flüssigem N_2

vorgekühlten Mörser das gesamte präparierte Tumorgewebe zu einem homogenen Gewebepulver verarbeitet. Für die Isolierung von Proteinen und DNA wurden Aliquots dieses Gewebepulvers eingesetzt.

3.19 Cisplatin- und Doxorubicinbehandlung eukaryontischer Zellen

Für die Behandlung der Zelllinien mit Zytostatika wurden 4×10^4 Zellen in die Vertiefungen von 24er-Zellkulturplatten ausgesät und diese über Nacht in Vollmedium kultiviert. Das Medium wurde danach durch 0,5 ml in verschiedenen Konzentration Zytostatika enthaltendes Medium ersetzt und weitere 28 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einen *in vitro*-Toxizitätstest eingesetzt und parallel die Zellzahl unbehandelter Zellen bestimmt, um Schwankungen in der Wachstumsgeschwindigkeit in diesen Test einbeziehen zu können.

3.19.1 Messung der *in vitro*-Toxizität mit dem MTT-Test

Die Bestimmung der Toxizität der Zytostatika mit dem MTT-Test beruht auf der Messung der Aktivität der Mitochondrien und somit der Proliferation von eukaryontischen Zellen. In diesem Test wird das wasserlösliche MTT, ein Tetrazolium-Salz, durch aktive mitochondriale Dehydrogenasen in lebenden Zellen in wasserunlösliches Formazan gespalten, das in Isopropanol gelöst werden kann. Die Spaltung wird begleitet von einem Farbumschlag von gelb nach violett, anhand dessen die Konzentration des Spaltproduktes photometrisch bestimmt werden kann. Zur Messung des Anteils der überlebenden Zellen wurden diese nach der Zytostatikabehandlung einmal mit PBS⁻ gewaschen und in einer 0,5 mg/ml MTT-Lösung in PBS mit 10% FKS für 3 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Lösung entfernt und das entstandene wasserunlösliche Formazan in saurem Isopropanol (0,1 M HCl in Isopropanol) aufgenommen. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt. Der durch die Anwesenheit von Zelltrümmern entstehende Hintergrund wurde bei 630 nm gemessen und subtrahiert.

3.19.2 DNA-Fragmentierung zum Apoptose-Nachweis

Um die Fragmentierung von DNA in Zellen zu überprüfen, wurden 1×10^5 Zellen in 6er-Zellkulturplatten und nach der Behandlung mit Zytostatika das Medium entfernt. Anschließend wurden die Zellen in 100 μ l Laurylsarcosylpuffer geerntet und bei verschiedenen Temperaturen wie folgt im Thermoblock inkubiert:

1 h bei 50°C

15 min bei 70°C

30 min bei 37°C

Die Proben wurden auf ca. 50°C gebracht und mit 1,5% Agarose gleicher Temperatur gemischt und sofort in die Taschen eines 1,5% Agarosegels gefüllt. Nach dem Abkühlen der Agaroseproben wurden die DNA elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht die sichtbaren DNA-Banden fotografiert.

3.20 Statistische Analyse

Die hier angewandten statistischen Verfahren sind von Bühl und Zöfel (1994) grundlegend beschrieben worden. In den Abbildungen werden Mittelwerte und als Streuungsmaß der Standardfehler des arithmetischen Mittels (S.E.M.) einer Behandlungsgruppe angegeben. Die statistischen Prüfverfahren beruhen auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Die nicht normalverteilten (Kolmogorov-Smirnov-Test) und unvarianten (Levene-Test) Daten wurden mit dem U-Test nach Mann und Whitney für zwei unabhängige Stichproben untersucht. Die statistischen Prüfverfahren wurden mit dem Programm SigmaStat (Jandel Corporation, USA) am PC durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

4.1 E1A-Mutanten

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden E1A-Mutanten generiert, die die Fähigkeit verloren haben sollten, primäre Nagerzellen zu immortalisieren und mit einem zweiten Onkogen vollständig zu transformieren. Ein weiterer Anspruch war, dass solche transformationsdefekten Mutanten möglichst alle für die E1A-Proteine beschriebenen tumorsupprimierenden Eigenschaften beibehalten oder sogar darüber hinausgehende Tumorsuppressorfunktionen haben sollten. Gleichzeitig sollten alle für die Tumorsuppression nicht benötigten Bereiche der E1A-Proteine deletiert werden, um zum einen ungewollte Regulationen zellulärer Gene zu vermeiden und zum anderen möglichst kleine Mutanten für eine eventuelle Herstellung bioaktiver Peptide zu erhalten, die zukünftig alternativ zu DNA-Konstrukten als Tumortheraeutika in Frage kommen könnten.

Dazu wurden ausgehend von der E1A-13S-cDNA die in Abb. 3 schematisch dargestellten Mutanten durch gerichtete Mutagenese im PCR-Verfahren unter Zuhilfenahme des „ExSite™ PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kits“ (Stratagene, Heidelberg) hergestellt und ihre Identität durch Sequenzierung verifiziert. Für weitere Untersuchungen wurden die Konstrukte in den eukaryontischen Expressionsvektor pRc-RSV kloniert.

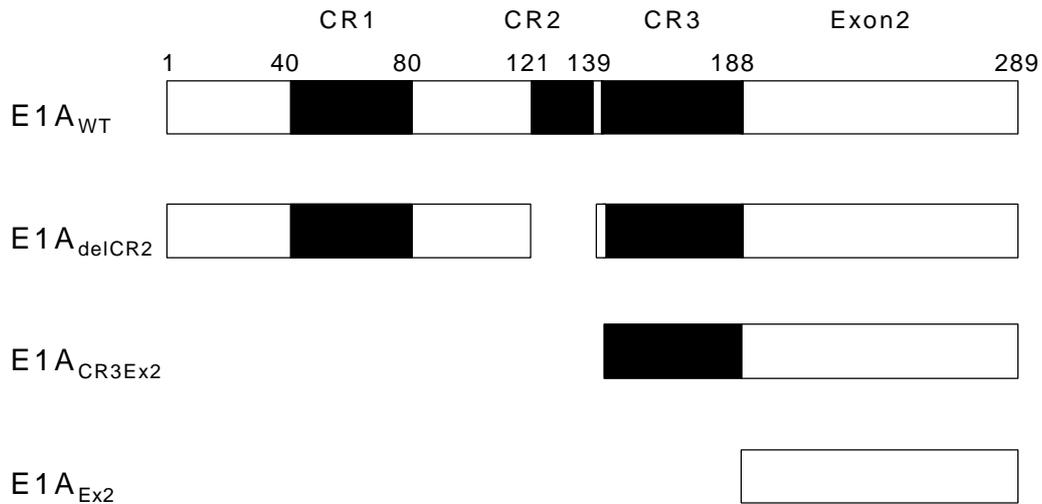


Abb. 3: Schematische Darstellung des Ad5 E1A-289R-Proteins (E1A_{WT}) und der resultierenden E1A-Mutanten. Die schwarzen Bereiche stellen die unter den verschiedenen Adenovirus Serotypen konservierten Regionen (CR1, CR2 und CR3) dar. Die Zahlen beziehen sich jeweils auf den ersten bzw. letzten Aminosäurerest der jeweiligen konservierten Region bzw. auf den ersten und letzten Aminosäurerest des Proteins.

4.1.1 Die Mutante E1A_{delCR2}

Bei dieser Mutante ist die konservierte Region 2 (CR2) von Aminosäure (AS) 120_{Ile} bis AS 138_{Glu} vollständig deletiert. Diese Region enthält unter anderem die Bindungsregionen für die Pockete Proteine pRB, p107 und p130 und bewirkt die Freisetzung von E2F-Transkriptionsfaktoren aus den Pockete Protein/E2F-Komplexen (Übersicht bei Jansen-Dürr, 1996). Die E1A_{delCR2}-Mutante sollte nicht mehr in der Lage sein, diese Freisetzung zu bewirken. Daher sollte sie die Fähigkeit, primäre Nagerzellen zu immortalisieren und mit einem zweiten viralen oder zellulären Onkogen zu transformieren, verloren haben (Lilli *et al.*, 1986; Whyte *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1997a). Allerdings sollte diese Mutante an den multifunktionellen transkriptionellen Koaktivator p300 binden können, da sowohl die CR1 als auch der komplette aminoterminal Bereich der Mutante intakt sind. Obwohl diese Bindung auch für die Transformation von Bedeutung ist, konnte gezeigt werden, dass gerade diese Funktion der E1A-Proteine essentiell für die Suppression der HER2/*neu*-

Transkription ist (Chen *et al.*, 1997a). Somit sollte diese Mutante die Tumorigenität HER2/*neu*-überexprimierender Tumoren reduzieren können. Ebenso sollte die Bindung der E1A-Proteine an p300/CBP zur Repression der Transkription verschiedener Matrix-Metalloproteinasen führen (Ofringa *et al.*, 1988, 1990; Frisch *et al.*, 1990). Da bei der Mutante das Exon 2 ebenfalls intakt ist, sollten alle dieser Region zugeschriebenen antimetastatischen Funktionen beibehalten sein (Sundquist *et al.*, 1998; Goppalakrishnan *et al.*, 1995). Die Mutante E1A_{delCR2} sollte zeigen, ob die für die Transformation relevante CR2 für die beschriebenen Tumorsuppressorfunktionen der E1A-Proteine entbehrlich ist.

4.1.2 Die Mutante E1A_{CR3Ex2}

Bei dieser Mutante sind die Aminosäuren 2_{Arg} bis 138_{Glu} deletiert. Sie enthält somit lediglich die CR3 und das Exon 2. Auch diese Mutante sollte transformationsdefekt sein. Da die Immortalisierung primärer Rattenzellen (BRK) durch das E1A-243R-Protein viel effizienter verläuft als durch das E1A-289R-Protein (Kuppuswamy und Chinnadurai, 1988), das sich durch das Vorhandensein der CR3 unterscheidet, ist zu vermuten, dass diese Region einen direkten antiproliferativen Einfluss hat oder indirekt die Expression zellzyklusreprimierender Proteine aktiviert. Die Mutante E1A_{CR3Ex2} sollte vorwiegend darüber Aufschluss geben, welche Rolle die transaktivierende Funktion der CR3 bei der Tumorsuppression spielt.

4.1.3 Die Mutante E1A_{Ex2}

Diese Mutante, in der die Aminosäuren 2 bis 186 deletiert sind, enthält lediglich das Exon 2 des E1A-Proteins. Dieser Bereich ist allerdings für die Bindung an CtBP essentiell (Schaeper *et al.*, 1998). Zumindest in primären Rattennierenzellen ist das Exon 2 auch für die Aufrechterhaltung der E-Cadherin-Expression und seine korrekte Lokalisierung innerhalb der Zelle mitverantwortlich (Goppalakrishnan und Quinlan, 1995). Mit Hilfe der Mutante E1A_{Ex2} sollte analysiert werden, ob das Exon 2 alleine für eine effektive Tumorsuppression ausreichend ist.

4.2 Funktionalität der E1A-Konstrukte

Um die Funktionalität der hergestellten E1A-Konstrukte zu überprüfen, wurde in transienten Expressionsstudien der Einfluss der Expression der E1A-Proteine auf die Aktivität des humanen *hsp70*-Promotors untersucht. Diese Funktion von E1A-Proteinen wurde bereits von Ström *et al.* (1998) beschrieben. Die für das Transaktivierungspotential benötigten Regionen der E1A-Proteine sind die Transaktivierungsdomäne CR3 und die im Exon 2 befindliche Region AR1 (auxilliary region 1) (Ström *et al.*, 1998). Die CR1 ist zusätzlich für die Rekrutierung der E1A-Proteine an den Promotor notwendig (Ström *et al.*, 1998). So bot die Untersuchung der Aktivierbarkeit des *hsp70*-Promotors durch die generierten E1A-Proteine die Möglichkeit, auch die Funktionen der E1A_{CR3EX2}-Mutante zu überprüfen.

Die E1A-Konstrukte und das *hsp70*-pGL2-Luciferase-Reporterplasmid wurden in BLM-Zellen kotransfiziert (Abb. 4). Das E1A_{WT289R}- und das E1A_{delCR2}-Protein aktivierten den *hsp70*-Promotor 20fach. Die Mutante E1A_{CR3EX2} bewirkte eine fünffache Aktivierung des Promotors. Zwar besitzt diese Mutante die Aktivierungsfunktion der CR3, da aber die für eine effektive Rekrutierung an den Promotor notwendige CR1 fehlt, war das Aktivierungspotential dieser Mutante vergleichsweise gering. Das als Kontrolle eingesetzte Ad2 E1A_{WT243R}-Konstrukt konnte aufgrund der fehlenden CR3 den Promotor kaum aktivieren. Das Aktivierungspotential der Mutante E1A_{EX2} war vergleichbar mit dem des Ad2 E1A_{WT243R}-Proteins. Western-Blot-Analysen zeigten, dass die unterschiedlichen Transaktivierungspotentiale der E1A-Konstrukte nicht auf Unterschiede in den Konzentrationen der entsprechenden E1A-Proteine in den Zellen zurückzuführen waren (Abb. 28). Somit war die Funktionalität der für die Aktivierung des *hsp70*-Promotors benötigten E1A-Regionen sichergestellt.

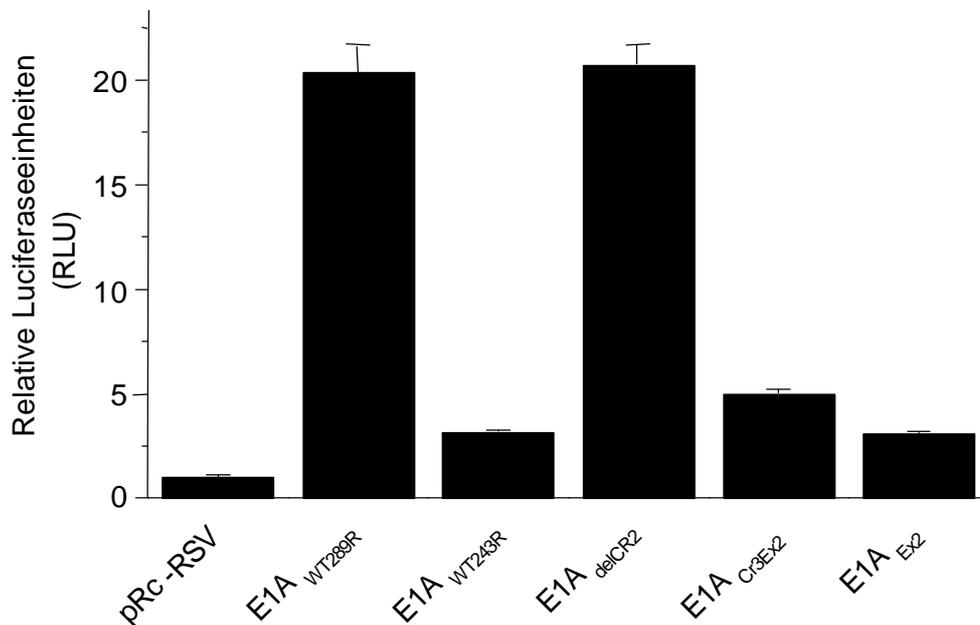


Abb. 4: Aktivierung des humanen *hsp70*-Promotors durch die E1A-Konstrukte. Es wurden das *hsp70*-Luciferase-Reporterkonstrukt und die jeweiligen E1A-Konstrukte bzw. der pRc-RSV-Leervektor in BLM-Zellen kotransfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h nach Transfektionsbeginn gemessen. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte +S.E.M. eines repräsentativen Experimentes in Dreifachbestimmung. Die Aktivierung in Anwesenheit des pRc-RSV-Vektors wurde auf 1 normiert.

4.3 Untersuchung des Transformationspotentials der E1A-Mutanten

Eine essentielle Voraussetzung für die Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit war die Eliminierung der transformierenden Eigenschaften der E1A-Mutanten. Zur Analyse des Transformationspotentials der E1A-Mutanten wurden primäre BMK-Zellen aus den Nieren vier bis sieben Tage alter immunkompetenter NMRI-Mäuse präpariert und mit den jeweiligen E1A-Konstrukten zusammen mit einem genomischen E1B-Fragment des Ad12 transfiziert. Die Kotransfektion der adenoviralen Region E1B ist für die Ausbildung eines vollständig transformierten Phänotyps notwendig (Yew und Berk, 1992).

Zunächst wurde die Anzahl der immortalen Zellklone bestimmt. Die Ergebnisse der Experimente sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Bei der Transfektion des E1A_{wt}-Konstrukts zusammen mit dem E1B-Konstrukt kam es zur Ausbildung zahlreicher Foci. Die Expression eines genomischen E1A_{Pst}-Fragmentes, das die gesamte E1A-Region umfasst, zusammen mit den E1B-Genprodukten ergab eine ähnlich hohe Focianzahl. Dagegen führte die Expression der jeweiligen mutierten E1A-Konstrukte zusammen mit dem E1B-Konstrukt in den BMK-Zellen in beiden unabhängigen Experimenten zur Bildung nur weniger Foci, deren Anzahl nicht die der Negativkontrollen überschritt. Die Foci wurden daraufhin auf ihre Fähigkeit untersucht, als Zelllinien zu wachsen. Die Zellklone, die sich nach Transfektion der mutierten E1A-Proteine ausbildeten, konnten in keinem Versuch als Zelllinie etabliert werden, wohingegen die Zellen, die das E1A_{wt}-Protein exprimierten, zumindest bis zur 20. Passage wuchsen und morphologisch einen transformierten Phänotyp aufwiesen. Dies bedeutet, dass die E1A-Mutanten nicht mehr in der Lage sind, BMK-Zellen in Kooperation mit den Ad12 E1B-Proteinen zu transformieren.

Transfizierte pRc-RSV-Konstrukte	Anzahl der Foci	
	Experiment 1	Experiment 2
Ad 5 E1A _{Pst} /Ad12 E1B	43/54/48	38/32/41
Ad5 E1A _{WT} /Ad12 E1B	56/51/42	37/45/42
Ad5 E1A _{delCR2} /Ad12 E1B	1/0/0	3/2/2
Ad5 E1A _{CR3Ex2} /Ad12 E1B	1/1/0	3/1/1
Ad5 E1A _{Ex2} /Ad12 E1B	1/3/3	4/1/0
pRc-RSV/Ad12 E1B	2/0/0	3/1//2
Ad12 E1B	2/1/0	1/2/2

Tab. 1: Überprüfung des Transformationsaktivität der E1A-Konstrukte. Es wurden 2×10^5 BMK-Zellen mit einem Ad12 E1B-Konstrukt und den aufgeführten Ad5 E1A-Konstrukten jeweils im pRc-RSV-Vektor, kotransfiziert. Als Negativkontrolle wurde das Ad12 E1B-Konstrukt alleine oder zusammen mit dem pRc-RSV-Vektor transfiziert. Die Anzahl der Foci wurde vier Wochen nach Transfektion bestimmt. Die

Tabelle zeigt die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente, die in Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden.

4.4 Charakterisierung der BLM- und H1299-Zelllinien bezüglich des HER-2/*neu*-Status

In der vorliegenden Arbeit wurden die Melanomzelllinie BLM und die Bronchialkarzinomzelllinie H1299 als zwei unterschiedliche humane Tumormodellsysteme genutzt, um die Tumorsuppressoreigenschaften der E1A-Proteine zu analysieren.

Der Mechanismus der Tumorsuppression HER-2/*neu*-überexprimierender Tumorzelllinien durch die E1A-Proteine ist durch eine Reihe von Untersuchungen größtenteils aufgeklärt (Yu *et al.*, 1991, 1993a, b). Um Voraussagen darüber treffen zu können, ob in den hier gewählten Zellsystemen die Repression des *HER-2/neu*-Promotors durch die Expression von E1A-Proteinen zu einer Reduktion der Tumorigenität führen könnte, wurde Expression des HER-2/*neu*-Proteins untersucht. Dazu wurden Gesamtzellextrakte der BLM- und H1299-Zelllinien in Western-Blots eingesetzt und das HER-2/*neu*-Protein mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Zum Vergleich wurden die Tumorzelllinien MDA-MB-361, MDA-MB-231 und MDA-MB-435 hinzugezogen, in denen das HER-2/*neu*-Protein in unterschiedlichem Expressionsmustern vorliegt.

Im Falle der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-361 ist das HER-2/*neu*-Protein überexprimiert und zeigte ein dementsprechendes Signal (Abb. 5A). In den Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435 ist das HER-2/*neu*-Protein nicht überexprimiert und seine Konzentration deutlich reduziert. Bei den BLM-Zellen war ein Signal in der Größe des HER-2/*neu*-Proteins zu detektieren, dessen Stärke vergleichbar mit der der Zelllinie MDA-MB-231 war. Aus dem Vergleich der detektierten Proteinmengen der Mammakarzinomzelllinien mit der der BLM-Zelllinie lässt sich daher schließen, dass das HER-2/*neu*-Protein in der BLM-Zelllinie nicht überexprimiert ist.

Der Vergleich der Mammakarzinomzelllinien, in denen das HER-2/*neu*-Protein in verschiedenen Konzentrationen vorliegt, mit der H1299-Zelllinie ergab, dass diese

Zelllinie ebenfalls nicht aus einem *HER-2/neu*-überexprimierenden Tumor stammt (Abb. 5B).

Es ist daher davon auszugehen, dass eine mögliche Tumorsuppressoraktivität der E1A-Mutanten in den BLM- und H1299-Zellen durch einen von der Repression des *HER-2/neu*-Promotors unabhängigen Mechanismus zustande kommen muss.

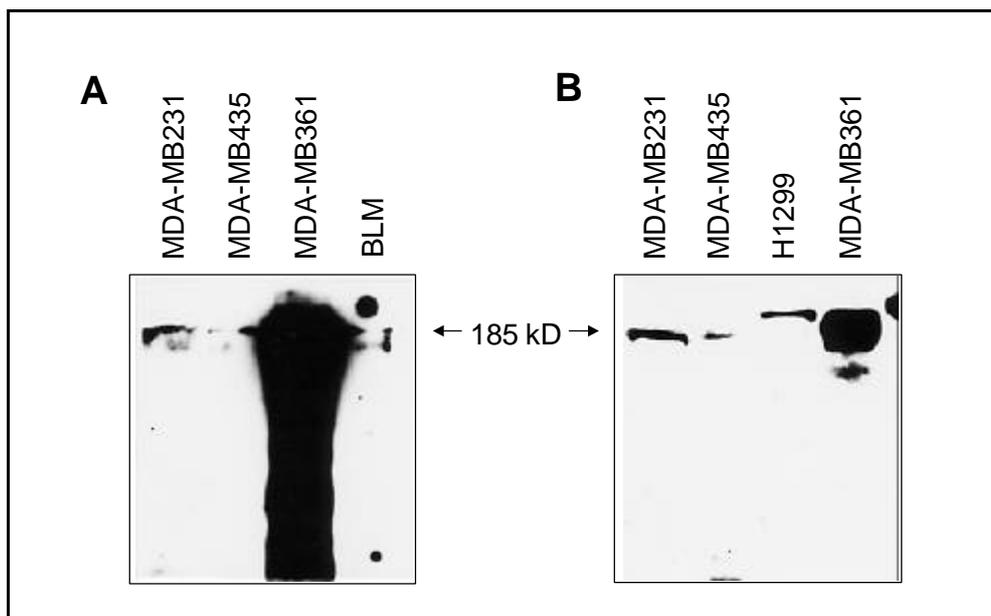


Abb. 5: Expression des *HER-2/neu*-Onkogens der parentalen BLM- und H1299-Zelllinien. Die Abbildungen zeigen Fluorogramme von Western-Blots, in denen in **A** 80 µg und in **B** 25 µg Zellextrakt der gekennzeichneten Zelllinien eingesetzt und die *HER-2/neu*-Expression mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen wurde. Die Lage des 185 kD Proteins ist markiert. In **A** repräsentieren die Banden unterhalb der 185 kD Proteinbande Abbauprodukte des *HER-2/neu*-Proteins. In **B** kommt die Verschiebung der detektierten Proteinbanden durch eine Laufverzerrung des Gels zustande.

4.5 Koloniebildung E1A-transfizierter BLM- und H1299-Zelllinien

Um einen Hinweis auf die zytotoxischen Eigenschaften der E1A-Konstrukte zu erhalten, wurde die Toleranz der untersuchten Zelllinien gegenüber der stabilen Integration der E1A-Konstrukte untersucht.

Die parentalen Zelllinien BLM und H1299 wurden dazu mit den jeweiligen E1A-Konstrukten transfiziert und für die G418-Resistenz selektiert. Nach zwei Wochen wurde die Anzahl der lebenden Zellkolonien nach Anfärbung mit einer Giemsa-Lösung bestimmt. Im Falle der BLM-Zelllinie hatten die Mutanten E1A_{CR3Ex2} und E1A_{Ex2} keinen Einfluss auf die Anzahl der G418-resistenten Kolonien im Vergleich zur Transfektion des pRc-RSV-Vektors. Dagegen führte die Expression des E1A_{WT}-Konstruktes und der E1A_{delCR2}-Mutante zu einer ca. 60%igen Reduktion der resistenten Kolonien (Abb. 6).

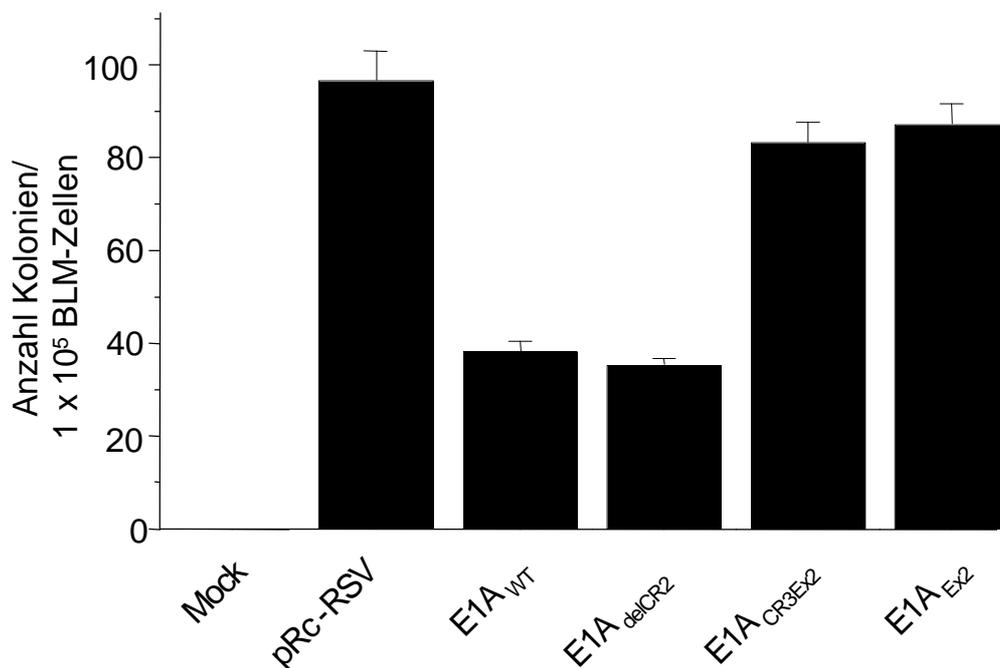
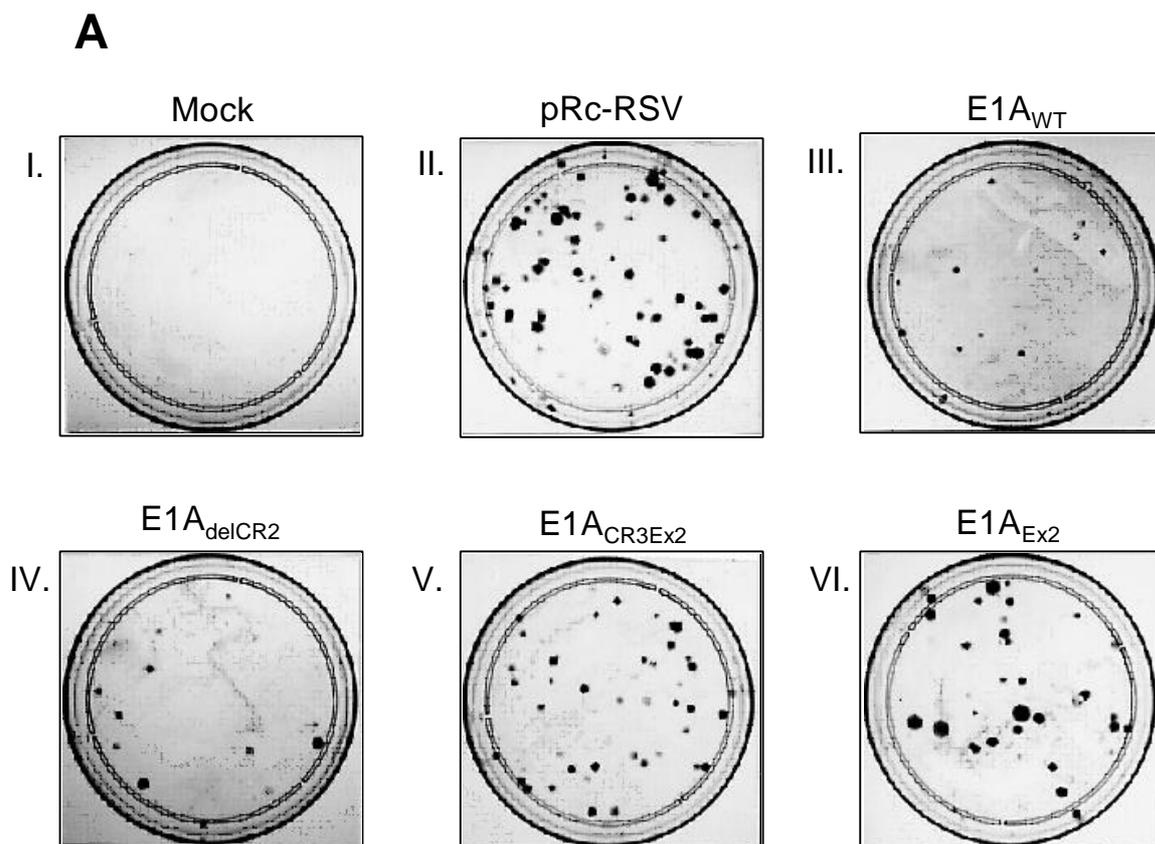


Abb. 6: Koloniebildung E1A-transfizierter BLM-Zellen. 1×10^5 Zellen wurden mit den jeweiligen E1A-Konstrukten transfiziert. Als Positivkontrolle diente die Transfektion des pRc-RSV-Vektors. Bei der Mock-Transfektion wurde kein Plasmid eingesetzt. Das Diagramm zeigt das Ergebnis eines von zwei Versuchen mit einer Dreifachbestimmung.

Die Abbildung 7 zeigt das für die H1299-Zellen erzielte Ergebnis, wobei in Abb. 7A die angefärbten Kolonien nach Transfektion der jeweiligen Konstrukte und Selektion mit G418 gezeigt sind. Im Falle der H1299-Zellen führte die Transfektion der E1A-Konstrukte E1A_{WT} und E1A_{delCR2} zu einer mehr als 60%igen Reduktion der Anzahl der Kolonien im Vergleich zur Positivkontrolle. Die Zahl der überlebenden Kolonien

nach der Transfektion der $E1A_{CR3Ex2}$ - und $E1A_{Ex2}$ -Mutanten war um ungefähr 45% verringert (Abb. 7B).

Um auszuschließen, dass die Unterschiede in der Anzahl der entstandenen Kolonien nach der Transfektion der jeweiligen E1A-Konstrukte lediglich auf unterschiedliche Konzentrationen der E1A-Proteine zurückzuführen waren, wurde in einem anderen Versuch die E1A-Expression nach Transfektion der jeweiligen Konstrukte verglichen (s. Abb. 28). Die Ergebnisse der Koloniebildung E1A-transfizierter Zellen deuten darauf hin, dass die Expression der $E1A_{WT}$ - und $E1A_{delCR2}$ -Konstrukte einen zytotoxischen Effekt sowohl in der BLM- als auch der H1299-Zelllinie hatte. Die Mutanten $E1A_{CR3Ex2}$ und $E1A_{Ex2}$ hatten nur in der H1299-Zelllinie einen deutlichen zytotoxischen Einfluss.



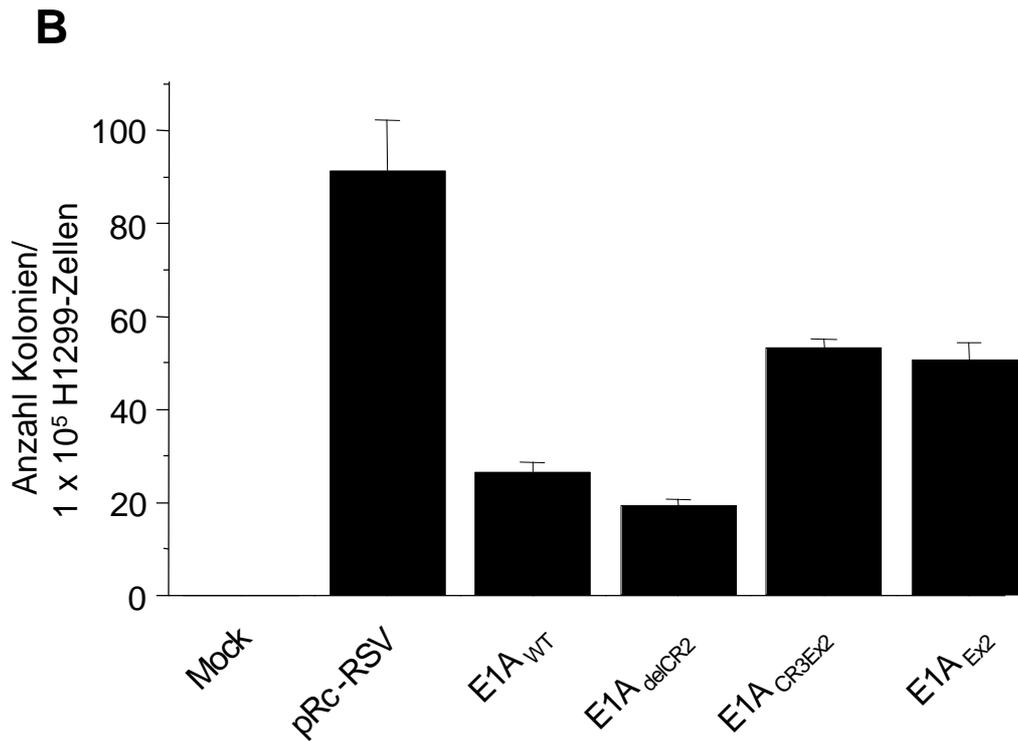


Abb. 7: Koloniebildung E1A-transfizierter H1299-Zellen. 1×10^5 Zellen wurden mit den jeweiligen E1A-Konstrukten oder dem pRc-RSV-Vektor als Positivkontrolle transfiziert. Bei der Mock-Transfektion wurde kein Plasmid eingesetzt. **A:** Dargestellt sind Zellkulturschalen mit G418-resistenten Kolonien nach Transfektion von H1299-Zellen mit **I.** Mock, **II.** pRc-RSV, **III.** E1A_{WT}, **IV.** E1A_{delCR2}, **V.** E1A_{CR3Ex2}, **VI.** E1A_{Ex2} **B:** Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte +S.E.M. der für die jeweiligen Konstrukte erhaltenen Anzahl G418-resistenter Kolonien aus einem von drei Versuchen, die jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt wurden.

4.6 Etablierung konstitutiv E1A-exprimierender Zelllinien

Um den Einfluss der E1A-Mutanten auf die Tumorigenität der Zelllinien BLM und H1299 untersuchen zu können, wurden die in den pRc-RSV-Vektor klonierten E1A-Konstrukte in die jeweilige Zelllinie transfiziert und mit dem Antibiotikum G418 für die auf dem Vektor befindliche Resistenz selektiert, um eine stabile Expression der transfizierten Konstrukte zu erreichen.

4.6.1 Etablierung der E1A-exprimierenden BLM-Zelllinien

Im Zuge der Etablierung konstitutiv E1A-exprimierender BLM-Zelllinien wurden die E1A-Expression von insgesamt 248 Zellklonen im Western-Blot-Verfahren analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass ein Großteil der G418-resistenten Zellklone, die zuvor entweder mit dem E1A_{WT}-oder dem E1A_{delCR2}-Konstrukt transfiziert wurden, keine Expression von E1A-Proteinen zeigten. So ließ sich bei nur fünf Zellklonen von insgesamt 96 resistenten E1A_{WT}-transfizierten Kolonien eine E1A-Expression im Western-Blot nachweisen. Im Falle der E1A_{delCR2}-Mutante zeigten sogar nur zwei von 94 untersuchten resistenten Kolonien eine E1A-Expression. Bei der Transfektion mit den beiden Mutanten E1A_{CR3Ex2} und E1A_{Ex2} war die relative Anzahl der G418-resistenten und gleichzeitig E1A-exprimierenden Zelllinien deutlich höher. Hier exprimierten jeweils über 90% der untersuchten G418-resistenten Klone die entsprechenden E1A-Proteine (s. a. Kap. 4.6.4). Die Problematik, G418-resistente Zelllinien zu etablieren, die gleichzeitig die E1A_{WT}-und E1A_{delCR2}-Konstrukte exprimierten, deutet auf eine Selektion gegen die Expression dieser E1A-Proteine hin (s. Kap 5.1).

4.6.2 Kontrolle der Unabhängigkeit der E1A-exprimierenden BLM-Zelllinien

Um die Unabhängigkeit der E1A-exprimierenden Zelllinien zu überprüfen, wurde die genomische Integration der E1A-cDNAs der den verschiedenen Zelllinien im Southern-Blot-Verfahren verglichen (Abb. 8).

In den Zelllinien E1A_{WT10}, E1A_{WT15} und E1A_{WT28} war das E1A_{WT}-Konstrukt nur jeweils einmal in das Genom der Zellen integriert. Die E1A-cDNA der E1A_{WT10}-Zelllinie war nur schwach detektierbar. Die Unabhängigkeit der beiden Zelllinien E1A_{WT15} und E1A_{WT28} konnte nicht völlig sichergestellt werden, da in dem Bereich von 21266 bp keine deutlichere Auftrennung der DNA-Fragmente erreicht wurde und somit ein Größenunterschied nicht eindeutig festgestellt werden konnte. In den übrigen untersuchten E1A-exprimierenden Zelllinien waren zwei oder mehr E1A-cDNAs des jeweiligen E1A-Konstruktes integriert. Es zeigten sich bei diesen Zelllinien unterschiedliche Integrationsmuster. Die Unabhängigkeit der Zelllinien war

damit mit Ausnahme der E1A_{WT}15- und E1A_{WT}28-Zelllinien gewährleistet. Für die weiteren Untersuchungen wurden immer mindestens zwei unabhängige Zelllinien mit dem gleichen E1A-Konstrukt verwendet.

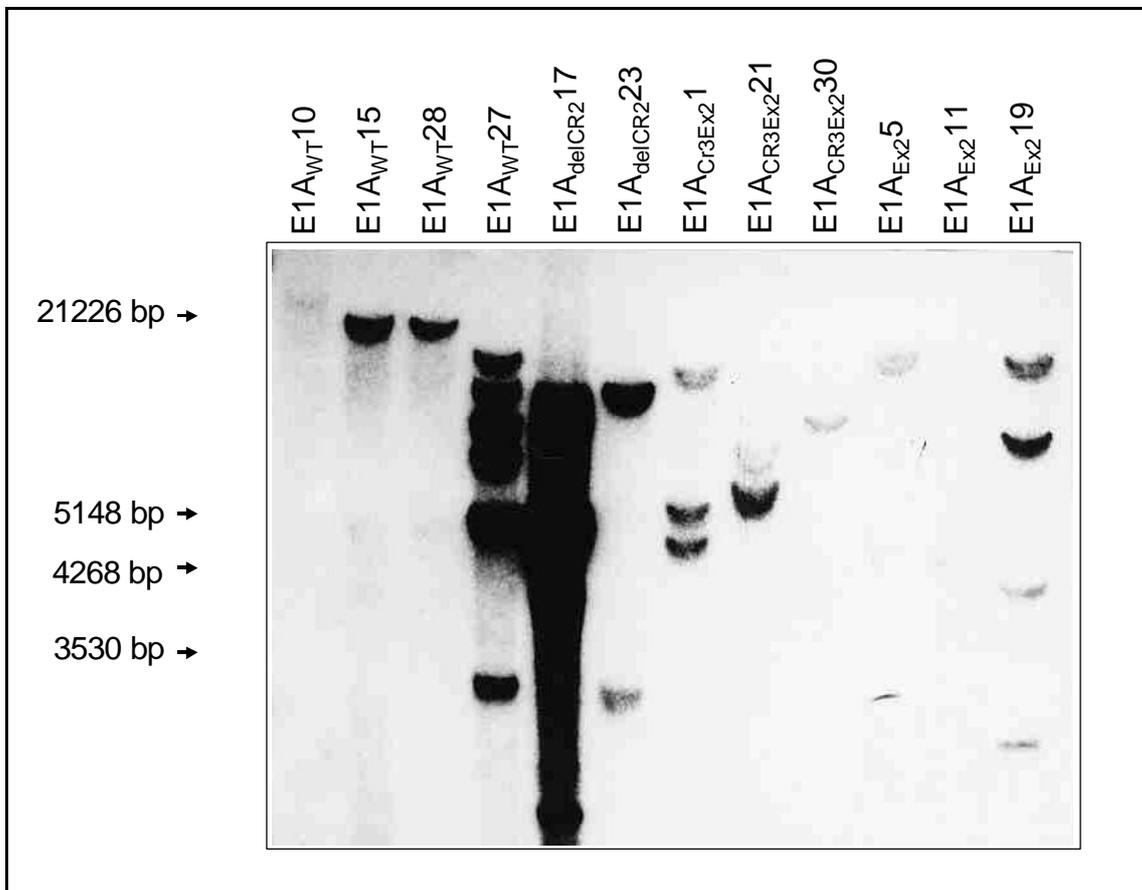


Abb. 8: Untersuchung der Unabhängigkeit der Integration der E1A-cDNAs in der Melanomzelllinie BLM. Die Abbildung zeigt beispielhaft ein Autoradiogramm eines Southern-Blots mit *Bgl* *II*-geschnittener genomischer DNA der hier gekennzeichneten E1A-exprimierenden Zelllinien. Als Sonde diente die E1A_{WT}-cDNA.

4.6.3 Etablierung der konstitutiv E1A-exprimierenden H1299-Zelllinien

Bei der Etablierung von E1A-exprimierenden H1299-Zelllinien wurde bei insgesamt 218 Zellkolonien die Expression der verschiedenen E1A-Proteine im Western-Blot-Verfahren untersucht. Dabei konnte von 84 G418-resistenten Zellklonen, die mit einem E1A_{WT}-Konstrukt transfiziert wurden, nur bei der E1A_{WT}19-Zelllinie die Expression des E1A-Proteins detektiert werden. Von 89 untersuchten G418-

resistenten und mit einem E1A_{delCR2}-Konstrukt transfizierten Zellklonen exprimierte lediglich die E1A_{delCR2}39-Zelllinie das entsprechende Konstrukt. Bei der Etablierung stabiler E1A_{CR3Ex2}-Zelllinien zeigten ca. 70% der untersuchten G418-resistenten Kolonien gleichzeitig eine E1A-Expression. Ca. 90% der mit dem E1A_{Ex2}-Konstrukt transfizierten Zellen, die G418-resistent waren, exprimierten auch das E1A-Protein. Auch in der H1299-Zelllinie fand offenbar während der Etablierung eine Selektion gegen die Expression der E1A_{WT}- und E1A_{delCR2}-Proteine statt (s. Kap.5.1).

Die Unabhängigkeit der E1A_{CR3Ex2}- und der E1A_{Ex2}-Zelllinien wurde dadurch sichergestellt, dass die jeweiligen Zellklone aus unterschiedlichen Transfektionsansätzen stammten. Bei den weiteren Untersuchungen wurden jeweils zwei unabhängige E1A_{CR3Ex2}- und E1A_{Ex2}-Zelllinien verwendet.

4.6.4 Expression der E1A-Konstrukte in den etablierten Zelllinien

Um sicherzustellen, dass die generierten Zelllinien die jeweiligen E1A-Konstrukte auch weiterhin exprimierten, wurde die Expression der E1A-Proteine im Western-Blot analysiert (s. Kap. 4.6.1 und 4.6.3). Die Abbildung 9 zeigt die E1A-Expression unterschiedlicher BLM-Zelllinien. In den verschiedenen E1A_{WT}-Zelllinien waren vergleichbare E1A-Proteinmengen zu detektieren. Unter den Zelllinien, die eine E1A-Mutante exprimierten, war die Expression der Proteine dagegen uneinheitlich. Es ergab sich aber keine Korrelation zwischen dem jeweiligen exprimierten E1A-Konstrukt und der Expressionsstärke der E1A-Proteine. In den E1A-exprimierenden H1299-Zelllinien zeigten sich lediglich geringe Unterschiede in der Expressionsstärke der E1A-Proteine. Bei der Zelllinie E1A_{WT}55 wurde die Expression eines verkürzten E1A_{WT}-Konstruktes detektiert und in der Zelllinie E1A_{delCR2}45 war keine E1A-Expression nachweisbar (Abb. 10). Die im Vergleich zu 293-Zellen sehr schwache E1A-Expression deutet darauf hin, dass bei der Etablierung der E1A-exprimierenden Zelllinien wahrscheinlich gegen eine hohe E1A-Expression selektiert wurde (s. Kap. 5.1).

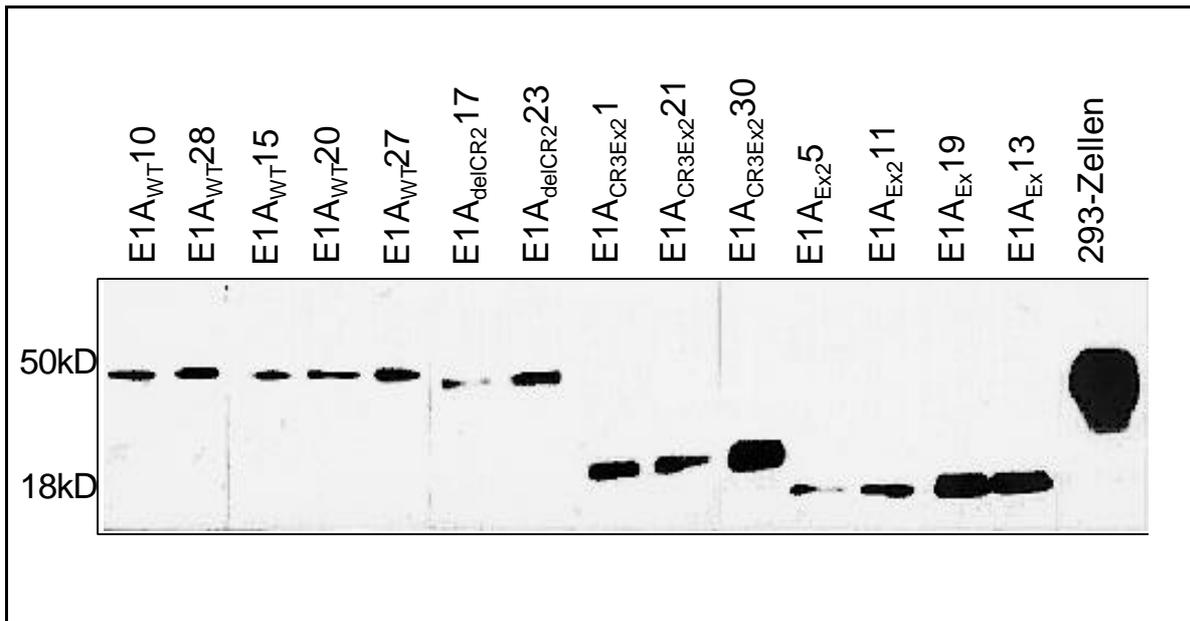


Abb. 9: Nachweis der E1A-Expression in den etablierten BLM-Zelllinien. Es wurden jeweils 50 μ g Protein der gekennzeichneten Zelllinien in den Western-Blot eingesetzt und die Expression mit einem E1A-spezifischen Antikörper analysiert. Als Positivkontrolle wurde 10 μ g Protein aus 293-Zellen eingesetzt.

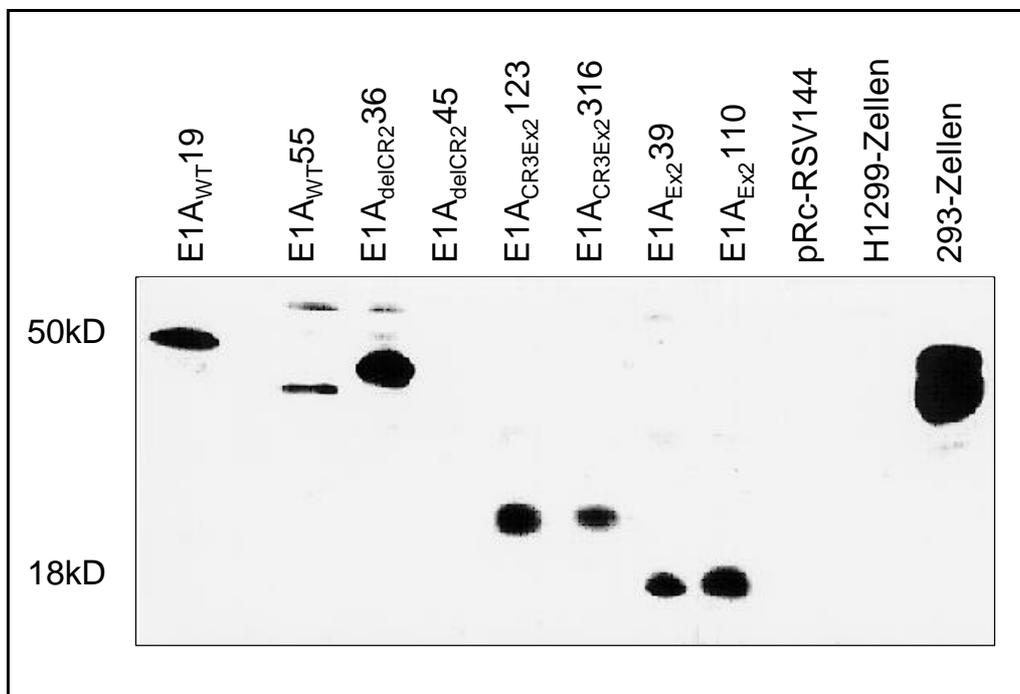


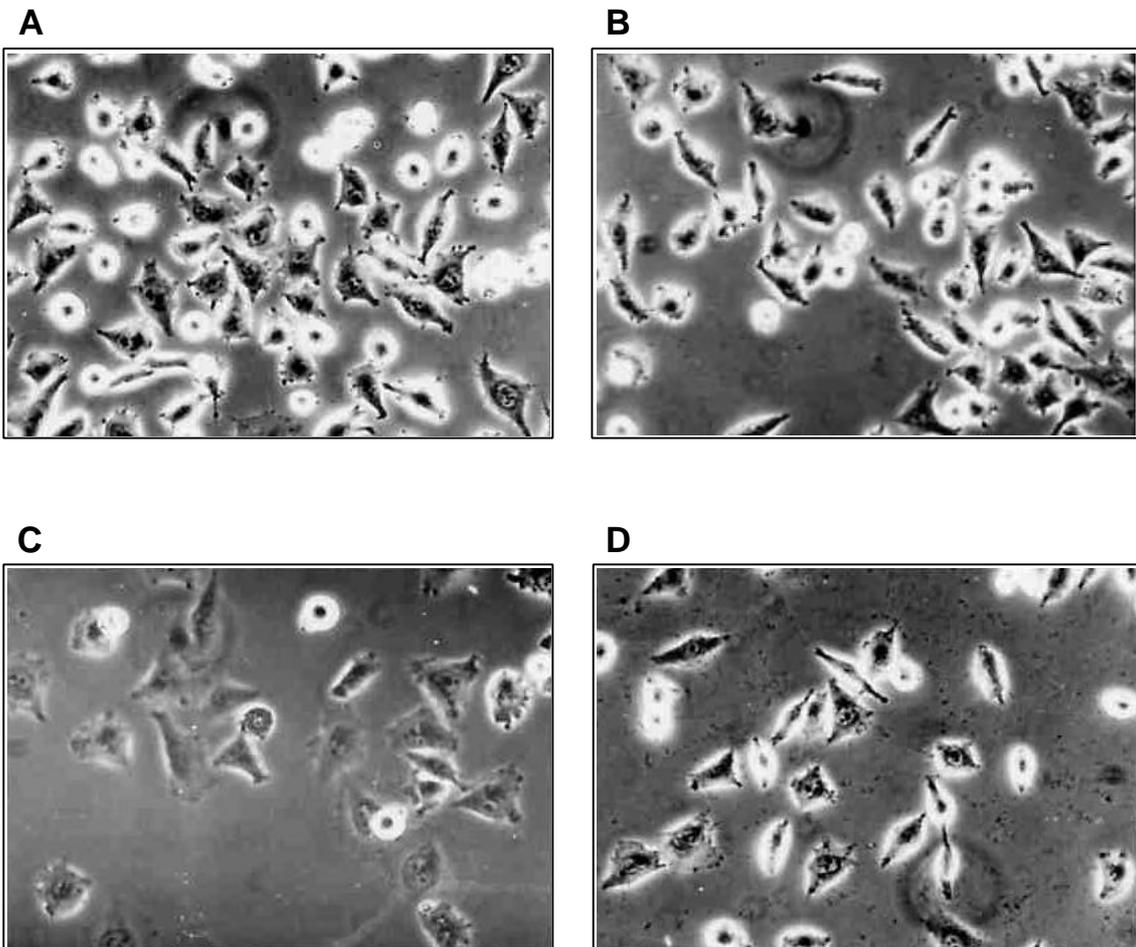
Abb. 10: Nachweis der E1A-Expression in den etablierten H1299-Zelllinien. Es wurden jeweils 50 μ g Protein der gekennzeichneten Zelllinien in den Western-Blot eingesetzt und die Expression mit einem E1A-spezifischen Antikörper analysiert. Als Positivkontrolle wurde 10 μ g Protein aus 293-Zellen eingesetzt.

In den folgenden Untersuchungen kamen nur solche Zelllinien zum Einsatz, in denen ein E1A-Protein korrekter molarer Masse exprimiert wurde. Dabei wurden möglichst nur solche Zelllinien ausgewählt, bei denen die in den Western-Blot-Analysen detektierten E1A-Proteinmengen vergleichbar waren, um auszuschließen, dass E1A-Funktionen auf unterschiedliche E1A-Proteinkonzentrationen zurückzuführen sind.

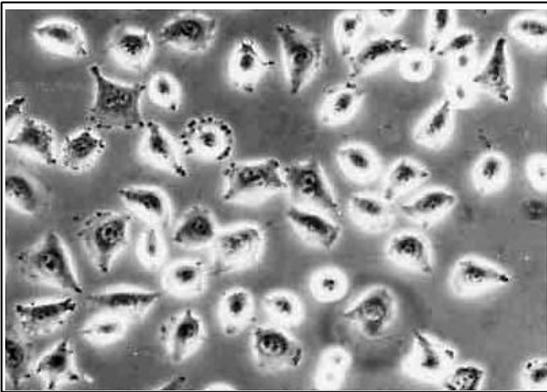
4.7 Morphologie der E1A-exprimierenden Zelllinien

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von E1A-Proteinen in verschiedenen Tumorzelllinien von morphologischen Veränderungen dieser Zellen begleitet sein kann (Frisch *et al.*, 1994; van Groningen *et al.*, 1996). Der Vergleich der Morphologie der E1A-exprimierenden Zelllinien sollte Aufschluss darüber geben, ob sich der transformierte Phänotyp der BLM- und H1299-Zelllinien zugunsten eines wie von Frisch *et al.* (1994) beschriebenen epithelialen Phänotyps verändert hatte. Die Zellen wurden für diesbezügliche Analysen bis zu ca. 30-40%iger Konfluenz kultiviert und dann im Phasenkontrastmikroskop bei 400facher Vergrößerung fotografiert. Die parentalen BLM-Zellen und die pRc-RSV-Zelllinie besaßen eine fibroblastenähnliche Morphologie. Die Zelllinie E1A_{WT}10 zeigte morphologische Veränderungen (Abb. 11C). Die Zellen breiteten sich flacher auf der Unterlage aus, während die übrigen Zelllinien mit einem E1A_{WT}-Konstrukt morphologisch kaum von den parentalen BLM-Zellen zu unterscheiden waren (Abb. 11D, E und F). Einige der E1A-Mutanten exprimierenden Zelllinien zeigten ebensolche Unterschiede im morphologischen Erscheinungsbild. So hatten die Zellen der Zelllinien E1A_{delCR2}17 (Abb. 11G), E1A_{CR3EX2}30 (Abb. 11J) und auch Zellen der E1A_{EX2}11-Linie (Abb. 11L) eine mit der E1A_{WT}10-Zelllinie vergleichbare Morphologie. Dagegen erschienen unabhängige Zelllinien, die die jeweiligen Konstrukte ebenfalls exprimierten (Abb. 11H, I und K) vergleichbar mit der parentalen Zelllinie eher fibroblastisch. In den E1A-exprimierenden H1299-Zelllinien waren zwar ebenfalls zum Teil morphologische Unterschiede zu erkennen, die jedoch nicht die Ausbildungen des epithelialen Phänotyps erkennen ließen (Daten nicht gezeigt).

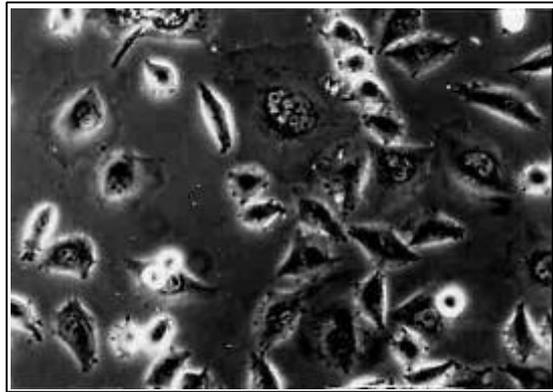
Die in diesen Analysen beobachteten morphologischen Veränderungen mancher E1A-exprimierender Zelllinien korrelierten nicht mit der Expression eines bestimmten E1A-Konstruktes. Die zu erkennenden Unterschiede sind möglicherweise auf die unterschiedliche genomische Integration der E1A-cDNAs der Zelllinien zurückzuführen. Trotz morphologischer Veränderungen kam es in keiner der hier untersuchten E1A-exprimierenden Zelllinie zur vollständigen Ausbildung eines wie von Frisch *et al.* (1994) beschriebenen epithelialen Phänotyps. Dies kann einerseits bedeuten, dass die Expression der E1A-Konstrukte nicht zur Ausbildung dieses Phänotyps führen kann. Andererseits ist es möglich, dass ein starker Selektionsdruck gegen das epitheliale Erscheinungsbild der Zellen vorherrscht (s. a. Kap. 5.1).



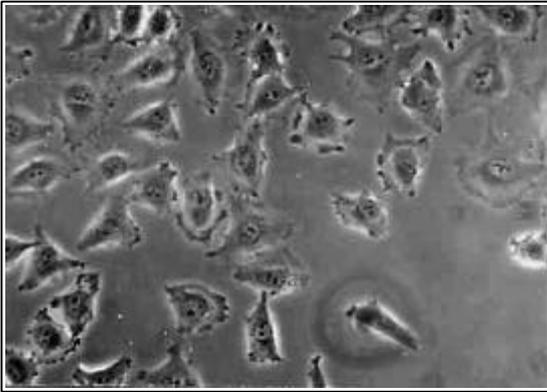
E



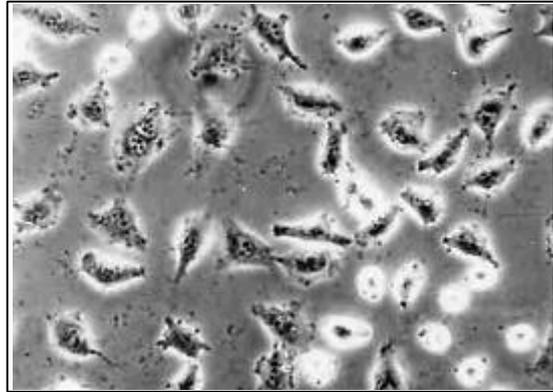
F



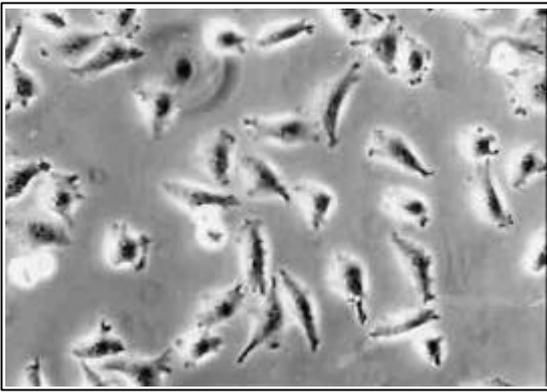
G



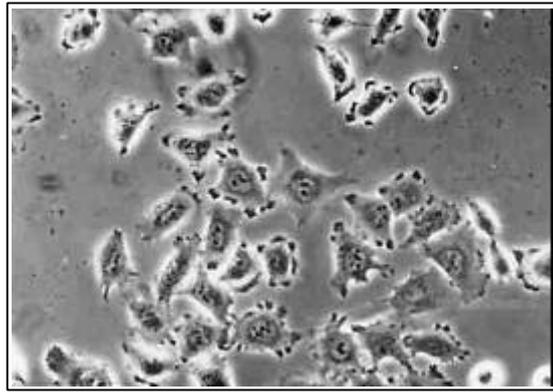
H



I



J



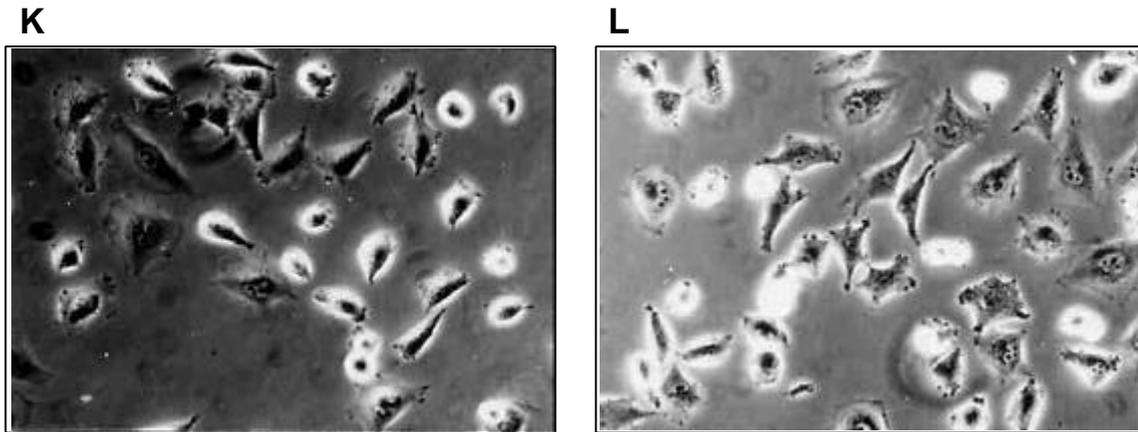


Abb.11: Morphologie parentaler bzw. E1A-exprimierender BLM-Zelllinien. A. BLM-Zellen, **B.** pRc-RSV-exprimierende BLM-Zellen, **C.-L.** BLM-Zelllinien mit stabiler Expression der E1A-Konstrukte. **C.** E1A_{WT}10, **D.** E1A_{WT}15, **E.** E1A_{WT}27, **F.** E1A_{WT}28, **G.** E1A_{delCR2}17, **H.** E1A_{delCR2}23, **I.** E1A_{CR3Ex2}1, **J.** E1A_{CR3Ex2}30, **K.** E1A_{Ex2}5, **L.** E1A_{Ex2}11. Die Zellen wurden im Phasenkontrast bei 400facher Vergrößerung fotografiert.

4.8 Expression von Tumormarkern in E1A-exprimierenden BLM- und H1299-Zelllinien

In früheren Experimenten, in denen ein genomisches E1A-Konstrukt stabil in BLM-Zellen exprimiert wurde, zeigte sich eine Reduktion der Expression einer Reihe von Tumormarkern, wie z. B. Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (PAI-1), PAI-2, Calcyclin, Vimentin, Interleukin-6. Die Expression dieser Progressionsmarker ist für stark metastasierende, maligne Melanome charakteristisch (van Groningen *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der konstitutiven Expression des E1A_{WT}-Konstruktes und der E1A-Mutanten in den BLM- und H1299-Zelllinien auf die Expression der Tumormarker PAI-1, Urokinase-Plasminogenaktivator (uPA) und Vimentin analysiert. Im Northern-Blot wurde die Expression von PAI-1 und uPA in den BLM-Zellen untersucht (Abb. 12). In den Zelllinien E1A_{WT}10, E1A_{delCR2}23 und E1A_{Ex2}5 war die PAI-1-Expression im Vergleich zur parentalen BLM-Zelllinie und zur pRc-RSV-Zelllinie deutlich reduziert. In anderen Zelllinien, die die gleichen E1A-Konstrukte exprimierten, war dagegen keine Modulation der PAI-1-Expression zu erkennen. Hingegen war in beiden Zelllinien, die die E1A_{CR3Ex2}-Mutante (Zelllinie 1 und 30) exprimierten, die Expression von PAI-1 reprimiert. Auch die Expression von

uPA war in den untersuchten Zelllinien moduliert. Unerwarteterweise kam es aber bereits durch die Integration des pRc-RSV-Vektors zu einer starken Reduktion der uPA-Expression. In den Zelllinien E1A_{WT}10, E1A_{WT}15 und E1A_{Ex2}11 war die uPA-Expression eher erhöht. In den Zelllinien E1A_{delCR2}23, E1A_{CR3Ex2}1, E1A_{CR3Ex2}30 und E1A_{Ex2}5 war die uPA-Expression wie bei der pRc-RSV-Kontrollzelllinie kaum noch detektierbar. In den E1A-exprimierenden H1299-Zelllinien war die Expression von PAI-1 und uPA gegenüber der parentalen Zelllinie nicht moduliert (Daten nicht gezeigt).

Es ist davon auszugehen, dass in den BLM-Zellen zumindest die uPA-Expression nicht durch die Expression der E1A-Konstrukte moduliert wurde, da schon die Integration des pRc-RSV-Vektors die Expression im Vergleich zur parentalen Zelllinie reprimierte.

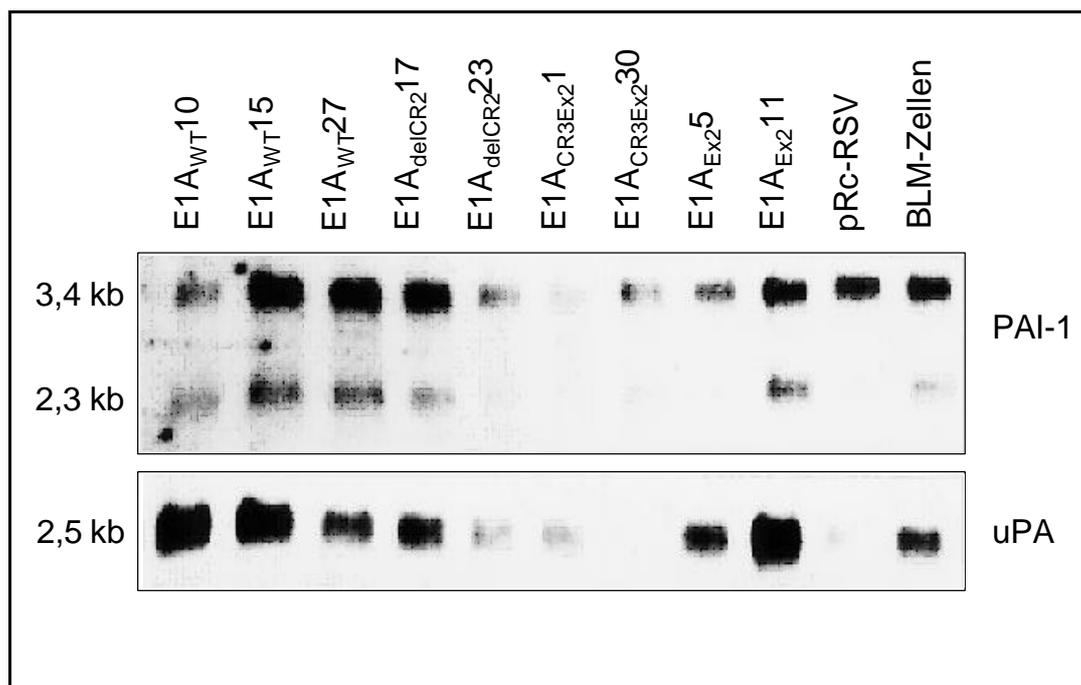


Abb. 12: Northern-Blot-Analysen der E1A-exprimierenden BLM-Zellen. Es wurden je gekennzeichnete Zelllinie 15 µg RNA eingesetzt. Als Kontrollen dienten die RNA der parentalen bzw. pRc-RSV-transfizierten Zelllinie. Für die Hybridisierung wurden eine homologe PAI-1- bzw. uPA-Sonde benutzt.

Des Weiteren wurde die Expression des Tumormarkers Vimentin in den E1A-exprimierenden Zelllinien in Western-Blot-Analysen untersucht (Abb.13). In Northern-Blot-Analysen von van Groningen *et al.* (1996) konnte gezeigt werden, dass durch die konstitutive Expression eines genomischen E1A-Konstruktes die Expression von Vimentin reprimiert wurde. Bei den hier untersuchten E1A-exprimierenden BLM-Zellen zeigten nur die Zellklone E1A_{WT}10 und E1A_{delCR2}17 eine deutliche Repression der Vimentinexpression. In anderen Zelllinien, die die gleichen E1A-Konstrukte exprimierten, war sie im Vergleich zur parentalen Kontrolle nicht moduliert (Abb. 13A). Auch in den E1A-exprimierenden H1299-Zelllinien wurde Vimentin unterschiedlich stark exprimiert (Abb. 13B). Bei der Zelllinie E1A_{delCR2}36 war die Expression von Vimentin kaum noch detektierbar. In den Zelllinien E1A_{CR3Ex2}316 und E1A_{Ex2}110 kam es ebenfalls zur starken Reduktion der Vimentinexpression, dabei zeigten die jeweiligen anderen Zelllinien, in denen die gleichen Konstrukte exprimiert wurden, keine Veränderungen hinsichtlich der Expression.

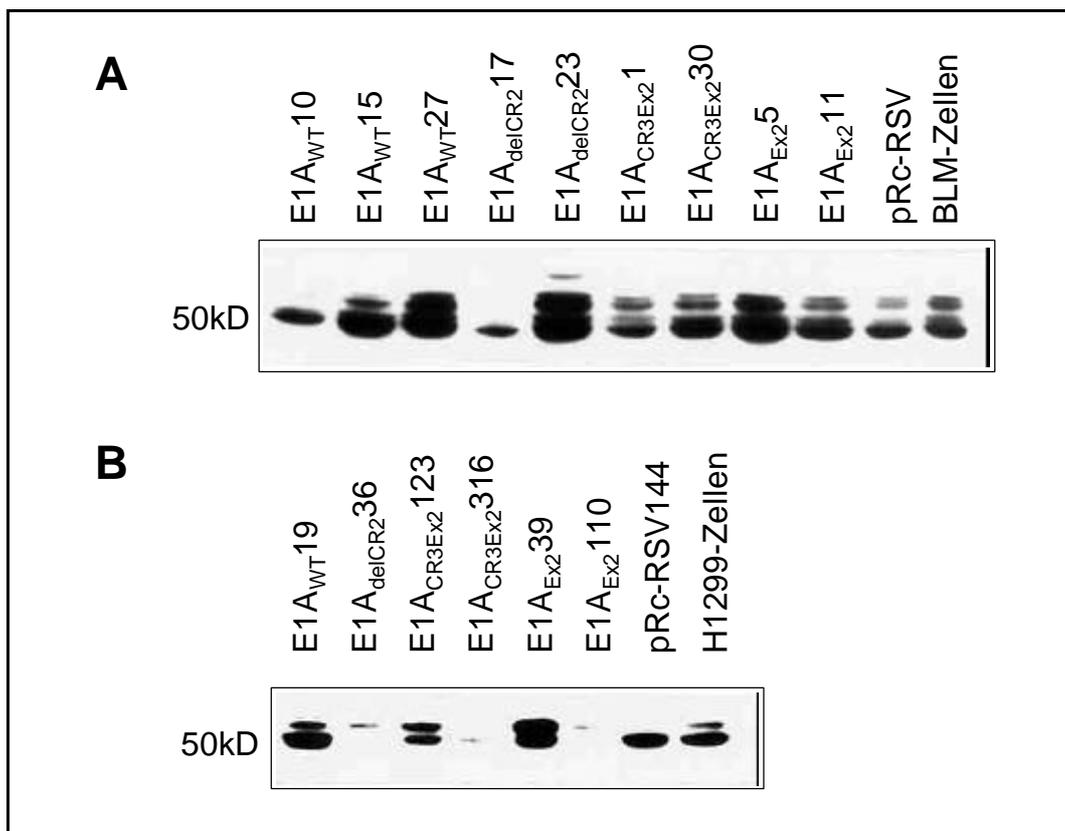


Abb. 13: Nachweis der Vimentinexpression in den E1A-exprimierenden A: BLM- und B: H1299-Zellen. Es wurden jeweils 50 µg Protein der gekennzeichneten Zelllinien in den Western-Blot eingesetzt und die Expression mit einem Vimentin-spezifischen Antikörper analysiert.

Die im Zuge der vorliegenden Arbeit hergestellten E1A-Konstrukte konnten die in früheren Experimenten gezeigte Reduktion der exprimierten Tumormarker in BLM-Zellen durch ein exprimiertes genomisches E1A-Fragment (van Groningen *et al.*, 1996) nur in einigen Zelllinien bewirken. Die sich ergebenden Unterschiede in der Expressionsstärke der Tumormarker korrelierten weder in den generierten BLM- noch in den H1299-Zelllinien mit der Expression der verschiedenen E1A-Konstrukte. Es ist davon auszugehen, dass die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Unterschiede im Expressionsmuster im Zuge der Etablierung durch die unterschiedliche genomische Integration der E1A-cDNAs zustande kamen.

4.9 Proliferationsverhalten der E1A-exprimierenden Zelllinien

Tumorzellen besitzen im Gegensatz zu normalen Zellen die Fähigkeit, relativ unabhängig von Wachstumsfaktoren zu proliferieren (Shih und Herlyn, 1993). Die Expression eines genomischen E1A-Konstrukts führte unter Serumentzug zur Reduktion der Wachstumsraten in einer murinen Melanomzelllinie (Deng *et al.*, 1998). Bei der Anwesenheit von Wachstumsfaktoren im Medium hatte die Expression von E1A aber keinen Einfluss auf die Proliferation (Deng *et al.*, 1998; Frisch, 1991). Um die Auswirkungen der stabilen Expression des E1A_{WT}-Konstrukts und der E1A-Mutanten auf die Proliferation der BLM- und H1299-Zelllinien zu analysieren, wurde die Wachstumsrate der E1A-exprimierenden Zelllinien unter subkonfluenten Bedingungen mit und ohne Serumreduktion untersucht.

Die Bestimmung der Zellzahlen der verschiedenen Zelllinien zeigte, dass die Serumreduktion generell in allen Zelllinien zu geringeren Proliferationsraten führte. Gleichzeitig nahm die Anzahl der lebenden Zellen nach 5tägiger Serumreduktion ab, obwohl bis dahin keine Konfluenz erreicht war. Die untersuchten BLM-Zelllinien zeigten sowohl bei 10% FKS als auch bei 0,1% FKS unterschiedliche Proliferationsgeschwindigkeiten, die sich aber nicht signifikant unterschieden (Abb. 14A und B). Die Zelllinie E1A_{WT}10 wies auch unter nicht-serumreduzierten Bedingungen mit 10% FKS ein deutlich verlangsamtes Wachstum auf. In den E1A-exprimierenden H1299-Zelllinien waren die Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit nicht signifikant (Abb. 14C und D). Die Untersuchungen

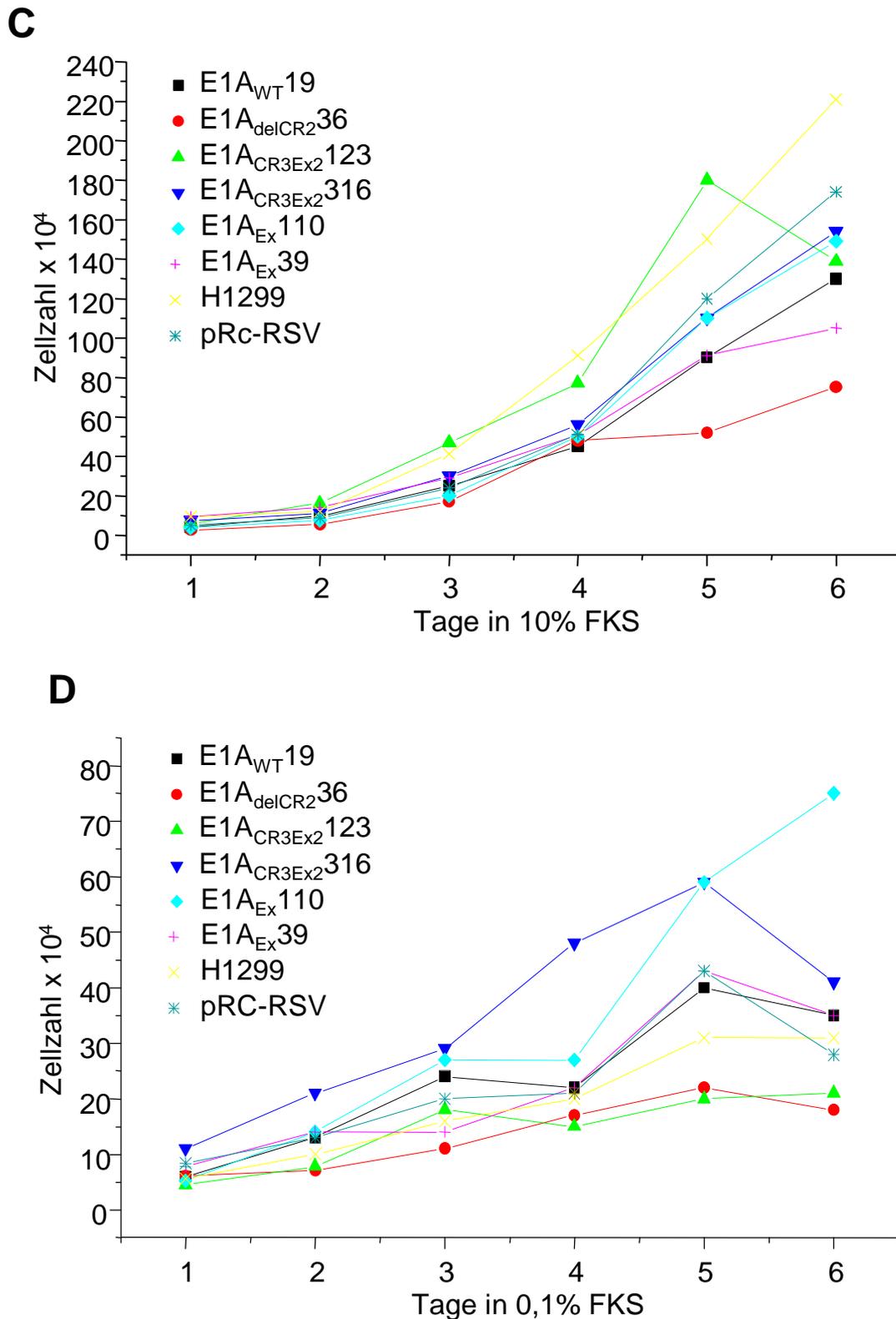


Abb. 14: Proliferation der BLM- und H1299-Zelllinien in 10% und 0,1% FKS. A und B: Es wurden 1×10^4 parentale oder E1A-exprimierende BLM-Zellen oder in **C** und **D** 2×10^4 parentale oder E1A-exprimierende H1299-Zellen ausgesät und nach 24 h und dann täglich zur gleichen Zeit die Zellzahl bestimmt. Beim Wachstum unter Serumreduktion (in **B** und **D**) wurde nach 24 h das Vollmedium durch Medium mit

0,1% FKS ersetzt. Die Graphiken zeigen die Ergebnisse eines Versuchs, der in Doppelbestimmung durchgeführt wurde.

4.10 Wachstum der E1A-exprimierenden Zelllinien in Weichagar

Die Fähigkeit in halbfestem Medium, d. h. kontaktunabhängig zu wachsen, gibt oft einen Hinweis auf die Tumorigenität maligner Zellen *in vivo* (Freedmann und Shin, 1974). Dabei spielt auch die Modulation der Expression verschiedener Oberflächen- und Adhäsionsproteine eine wichtige Rolle (Sethi *et al.*, 1999). Um Voraussagen über die Tumorigenität der E1A-exprimierenden Zelllinien *in vivo* machen zu können, wurde ihre Fähigkeit untersucht, in Weichagar zu wachsen.

Die Abbildung 15 zeigt die für die BLM-Zelllinie und ihre E1A-exprimierenden Derivate erzielten Ergebnisse. Die parentale BLM-Zelllinie und die pRc-RSV-Kontrollzelllinie bildeten in halbfestem Medium zahlreiche Foci aus. Die E1A_{Ex2}-exprimierenden Zelllinien (Zelllinie 5, 11 und 19) hatten die unverminderte Fähigkeit, in Weichagar zu wachsen. Vier von fünf untersuchten Zelllinien, die Zelllinien E1A_{WT}15, E1A_{WT}20, E1A_{WT}27 und E1A_{WT}28, wuchsen ebenfalls unbeeinflusst von der Expression des E1A_{WT}-Konstruktes. Hingegen war die E1A_{WT}10-Zelllinie nicht mehr in der Lage, in Weichagar zu wachsen. Die Zelllinien, in denen die jeweiligen Mutanten E1A_{delCR2} (Zelllinie 17 und 23) bzw. E1A_{CR3Ex2} (Zelllinie 1, 21 und 30) exprimiert wurden, waren nur noch vermindert befähigt, Foci auszubilden. Dabei ergab sich eine Reduktion der Focianzahl bis zu 40% bei der E1A_{delCR2}23 bis zu maximal 60% bei der E1A_{CR3Ex2}30 Zelllinie gegenüber der Parentalzelllinie BLM ($p < 0,01$).

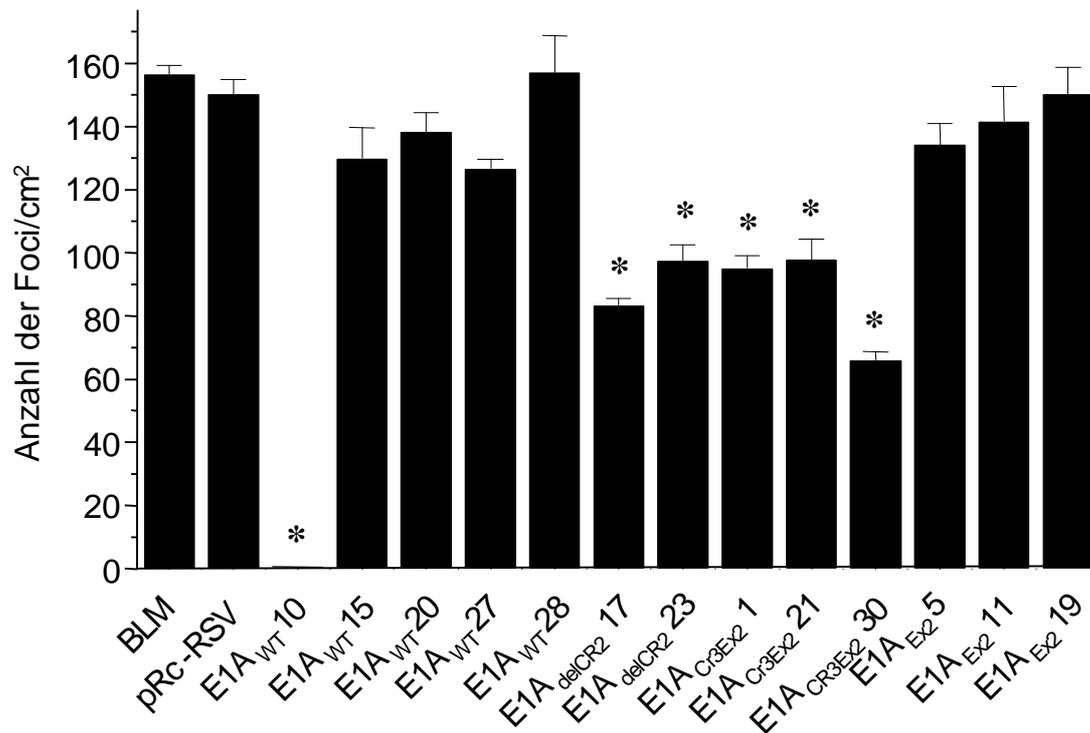


Abb. 15: Wachstum der E1A-exprimierenden BLM-Zelllinien in Weichagar. Es wurden 5×10^3 Zellen je Vertiefung einer 6er-Zellkulturplatte in der Testschicht des Weichagars ausgesät und die Anzahl der Foci nach einer Inkubationsdauer von drei Wochen bestimmt. Die Abbildung zeigt eines von drei durchgeführten Experimenten. Aufgeführt sind die Mittelwerte +S.E.M. der ausgezählten Foci/cm² einer Dreifachbestimmung. Signifikante Veränderungen gegenüber der parentalen Zelllinie wurden mit dem U-Test nach Mann und Whitney für nicht normalverteilte unvariante Daten bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ bestimmt. Der * gibt signifikante Unterschiede an.

Die parentale H1299-Zelllinie war wie die BLM-Zelllinie in der Lage, in Weichagar Foci auszubilden (Abb. 16). Eine H1299-Zelllinie, in der der pRC-RSV-Vektor integriert war, bildete ähnlich viele Foci aus. Auch die Zelllinien, die die E1A_{Ex2}-Mutante (E1A_{Ex2}39 und E1A_{Ex2}110) und das E1A_{WT}-Konstrukt exprimierten, zeigten keine Veränderungen bezüglich ihrer Wachstumsfähigkeit in halbfestem Medium. Hingegen wies die Zelllinie E1A_{delCR2}36 eine signifikante Reduktion der Focusbildung von über 80% gegenüber der pRC-RSV-Kontrollzelllinie auf. Bei den E1A_{CR3Ex2}-Zelllinien war die jeweilige Anzahl der Foci um ca. 80% (E1A_{CR3Ex2}123) bzw. 70% (E1A_{CR3Ex2}316) ebenfalls signifikant vermindert.

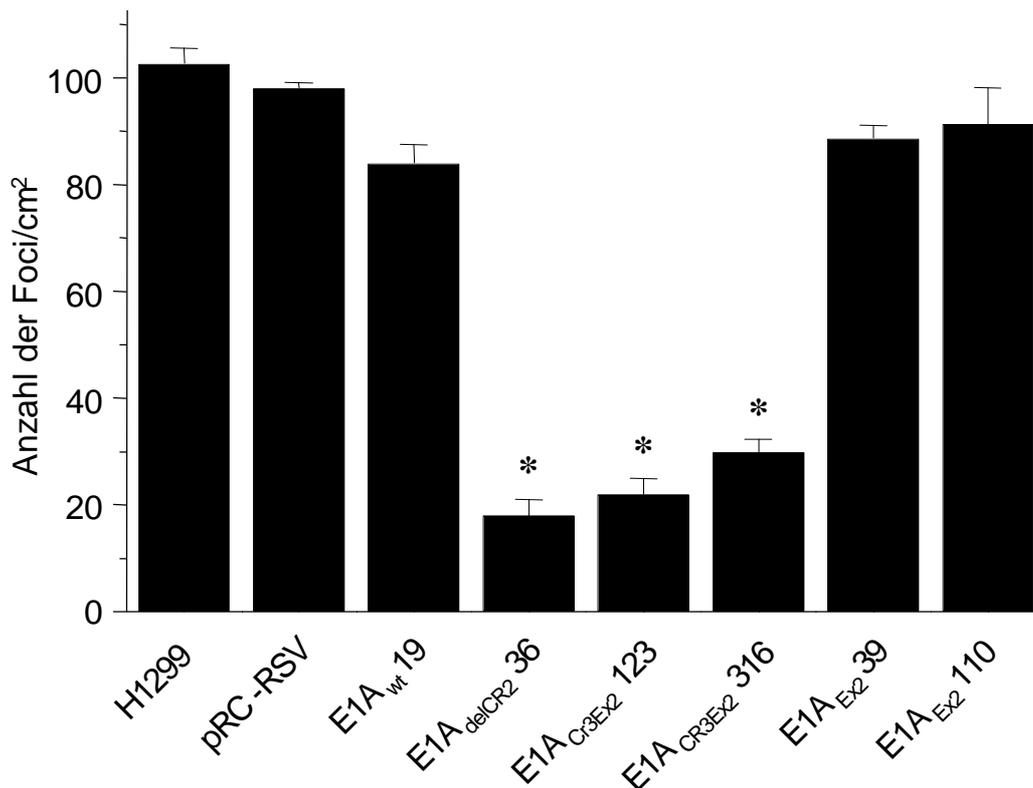


Abb. 16: Wachstum der E1A-exprimierenden H1299-Zelllinien in Weichagar. Es wurden 6×10^3 Zellen wie in Abb. 15 beschrieben ausgesät. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der Anzahl der Foci/cm² +S.E.M. eines von drei durchgeführten Experimenten in einer Dreifachbestimmung. Signifikante Veränderungen gegenüber der parental Zelllinie wurden mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ bestimmt. Der * gibt signifikante Unterschiede an.

Die Expression der Mutanten E1A_{delCR2} und E1A_{CR3Ex2} reduzierte die Fähigkeit der BLM- und H1299-Zelllinien signifikant, Foci in halbfestem Medium auszubilden. Dabei waren Unterschiede in der Proliferation unter den Kulturbedingungen ausgeschlossen (s. a. Kap. 4.9). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Expression dieser Mutanten die Tumorigenität der H1299- und BLM-Zellen reprimiert.

4.11 Tumorigenität der E1A-exprimierenden Zelllinien *in vivo*

Um die in den Weichagarversuchen erzielten Ergebnisse in Bezug auf die Tumorigenität der etablierten Zelllinien *in vivo* zu untersuchen, wurden die Zelllinien in einer zuvor getesteten optimalen Zellzahl immundefizienten Mäusen subkutan injiziert und das Tumorwachstum analysiert.

4.11.1 Tumorigenität der BLM-Zelllinien

In einer ersten Versuchsreihe wurden 3×10^6 Zellen weiblichen nu/nu Mäusen subkutan in die Vorderlaufbeuge injiziert und bei vorhandenem Tumor dreimal wöchentlich dessen Größe vermessen (Abb. 17).

Die parentale Zelllinie bildete nach 10 - 14 Tagen große Tumoren mit einem exponentiellen Wachstumsverlauf aus. Die Zelllinien E1A_{WT}15 und E1A_{WT}27 (Abb. 17A und B) zeigten nach ihrer Inokulation eine geringfügig verzögerte Tumorentstehung im Vergleich zur parentalen BLM-Zelllinie. Dagegen begann nach Inokulation der Zelllinie E1A_{delCR2}17 die Ausbildung von Tumoren mit einer deutlichen Verzögerung von sieben Tagen. Zu diesem Zeitpunkt hatten sich in den Kontrolltieren schon große Tumoren entwickelt (Abb. 17B). Die zur parentalen Zelllinie vergleichbaren Tumorgößen waren erst nach dem doppelten Zeitraum ausgebildet. Nach der verlängerten Latenzzeit wuchsen die Tumoren ebenfalls mit exponentiellem Verlauf. Die Linie E1A_{CR3EX2}1 zeigte eine ebensolche Verzögerung der Tumorbildung nach Beginn der Inokulation (Abb. 17A). Dabei verlängerte sich die Latenzzeit um vier Tage gegenüber der parentalen Zelllinie. Die Datenaufnahme musste hier aber bei einem Tier nach 15 Tagen abgebrochen werden. Bei den beiden anderen Tieren kam es trotz der Verzögerung ebenfalls zur Ausbildung mit der parentalen Zelllinie vergleichbarer Tumoren.

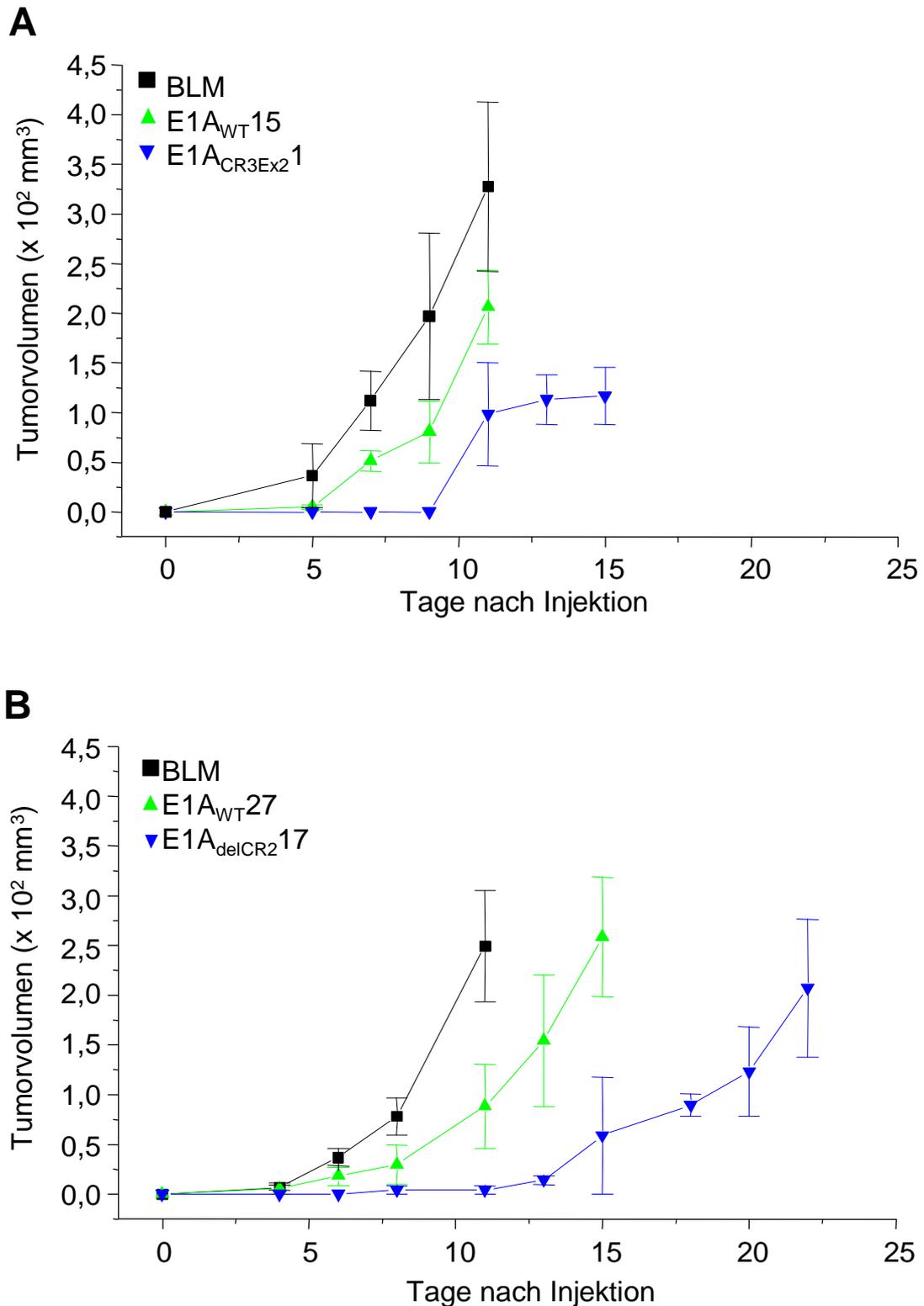


Abb. 17: Repression der Tumorigenität der BLM-Zelllinien durch die stabile Expression der E1A-Mutanten A. E1A_{CR3Ex2} und B. E1A_{delCR2}. Es wurden jeweils 3×10^6 Zellen in die Vorderlaufbeuge von nu/nu Mäusen injiziert und die Größe der entstehenden Tumoren alle drei bis vier Tage gemessen. Das Volumen wurde wie in Kap. 3.18.2 beschrieben bestimmt. Die Messpunkte sind Mittelwerte von drei Tieren \pm S.E.M.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde den Tieren die zu analysierenden Zelllinien subkutan in die hintere Flanke injiziert (Abb. 18). Dies erlaubte eine längere Beobachtung der Tumorenstehung als in der ersten Versuchsreihe. Generell konnten die Ergebnisse bezüglich der Tumorigenität der E1A_{delCR2}- und E1A_{CR3EX2}-exprimierenden Zelllinien der ersten Versuchsreihe bestätigt werden. Die E1A_{delCR2}23- und E1A_{CR3EX2}30-Zelllinie zeigten ebenfalls eine stark verzögerte Tumorausbildung nach der Inokulation. Das Tumorstadium begann erst zu einem Zeitpunkt als die parentale Zelllinie in allen Tieren bereits große Tumoren entwickelt hatte. Nach Beginn des Auswachsens konnte auch in diesen Zelllinien ein mit der parentalen BLM-Zelllinie vergleichbares exponentielles Wachstum beobachtet werden. Eine ebenfalls deutlich geringere Tumorigenität im Nacktmausmodell wies eine mit einem E1A_{WT}-Konstrukt stabil transfizierte Zelllinie (E1A_{WT}10) auf. Im Gegensatz zu allen anderen analysierten E1A_{WT}-Zelllinien war sie nach einer stark verlängerten Latenzzeit in der Lage, Tumoren auszubilden (Abb. 18A). Zwei unabhängige Zelllinien, die das E1A_{EX2}-Konstrukt (E1A_{EX2}5 und E1A_{EX2}11) konstitutiv exprimierten, verhielten sich gegenüber der parentalen Zelllinie unverändert in Bezug auf ihre Tumorigenität *in vivo*. Es wurden zwei weitere Zelllinien untersucht, die das E1A_{WT}-Konstrukt (E1A_{WT}20 und E1A_{WT}28) exprimierten (Abb. 18B). Wie in der ersten Versuchsreihe zeigten beide Zelllinien im Vergleich zur BLM-Zelllinie keine veränderte Tumorigenität. Zur Kontrolle wurde eine Zelllinie inokuliert, in der der pRc-RSV-Vektor stabil integriert war. Auch diese Zelllinie zeigte keine veränderte Tumorigenität in der Nacktmaus.

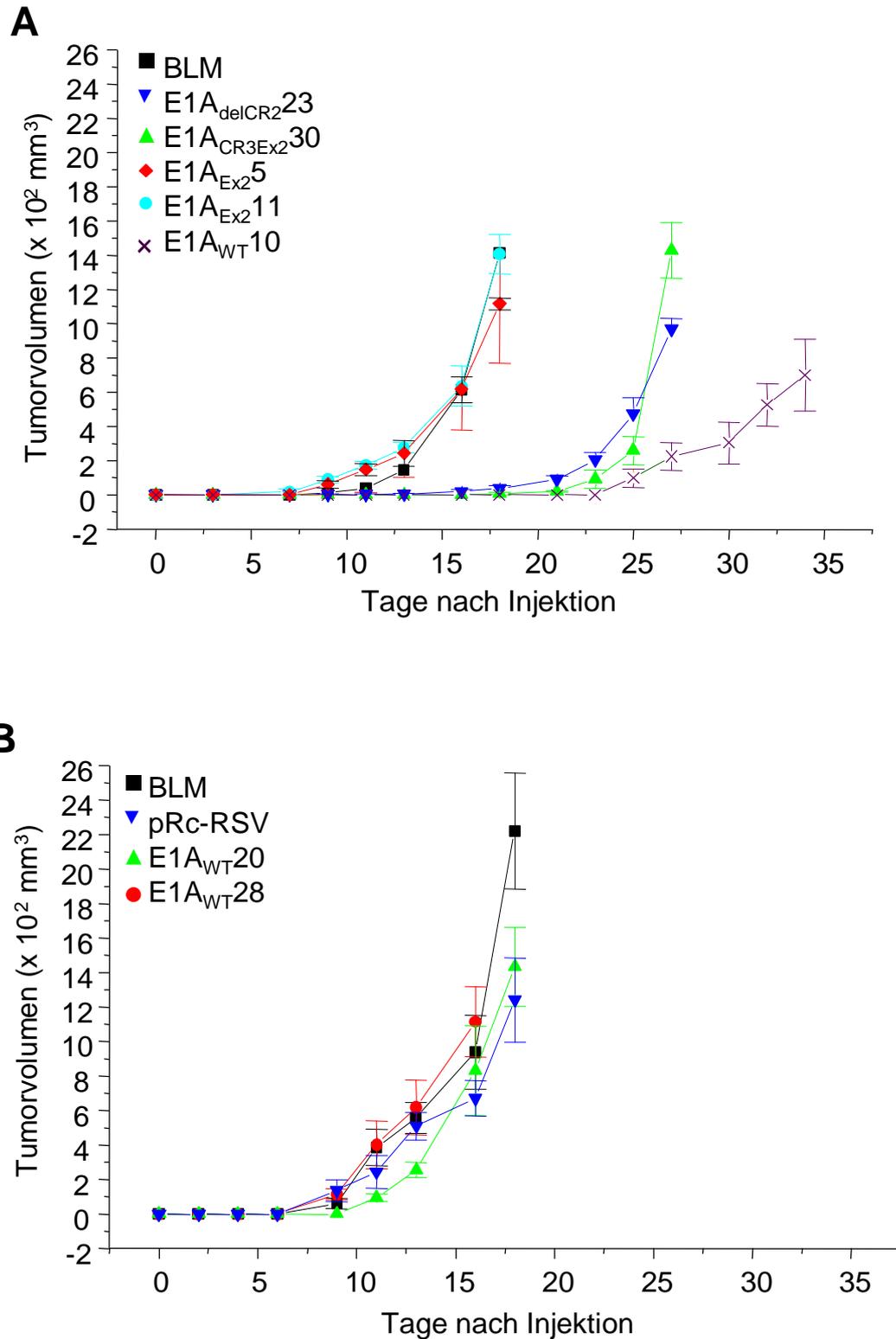


Abb. 18: Repression der Tumorigenität der BLM-Zelllinien durch die stabile Expression der E1A-Konstrukte. A: Repression der Tumorigenität in den Zelllinien E1A_{delCR2}23, E1A_{CR3Ex2}30 und E1A_{WT}10. **B:** nicht reprimierte E1A_{WT}-Zelllinien. Es wurden jeweils 3×10^6 Zellen in die Flanke von nu/nu Mäusen injiziert und die Größe der entstehenden Tumore alle drei bis vier Tage gemessen. Das Volumen wurde wie

in Kap. 3.18.2 beschrieben bestimmt. Die Messpunkte sind Mittelwerte von drei bzw. vier Tieren \pm S.E.M.

Die Expression der Mutanten E1A_{delCR2} und E1A_{CR3Ex2} führte in den BLM-Zellen zu einer deutlichen Reduktion der Tumorigenität. Dabei korrelierte die Tumorigenität nicht mit der Expression spezifischer Tumormarkern in den untersuchten Zelllinien (vergl. Kap. 4.8). Es konnte ausgeschlossen werden, dass die Verzögerung der Bildung von Tumoren durch veränderte Wachstumsraten der Zelllinien, die die E1A_{delCR2}- und E1A_{CR3Ex2}-Mutanten exprimierten, zustande kamen (s. Kap. 4.9).

4.11.2 Tumorigenität der E1A-exprimierenden H1299-Zelllinien

Um die Tumorigenität der E1A-exprimierenden H1299-Linien *in vivo* zu analysieren, wurden 1×10^7 Zellen der entsprechenden Zelllinien in Nacktmäuse inokuliert (Abb. 19). Nach ca. vier Wochen begannen die parentale und die pRc-RSV-transfizierte H1299-Zelllinien Tumoren auszubilden, die nach sechs bis sieben Wochen zu großen Tumoren ausgewachsen waren. Ihr Wachstum wies dabei einen exponentiellen Verlauf auf. Die durch die E1A_{Ex2}-Linien entstandenen Tumoren wuchsen nach der gleichen Latenzzeit aus und zeigten somit keine Veränderung im Vergleich zur parentalen H1299-Zelllinie. Die E1A_{WT}-exprimierende Zelllinie bildete nach einer geringfügigen Verzögerung ebenfalls Tumoren aus. Die Zelllinie E1A_{delCR2}39 hingegen hatte die Fähigkeit zur Tumorinduktion verloren. Bis zum Abbruch des Versuches nach elf Wochen, wuchs in keinem der drei Tiere, denen diese Zelllinie injiziert worden war, Tumoren aus. Die Mutante E1A_{CR3Ex2} war in der Lage, das Auswachsen der H1299-Zellen zu Tumoren in den Mäusen signifikant zu verzögern. Die Zelllinie E1A_{CR3Ex2}316 bildete in zwei von fünf Tieren keine Tumoren aus, nach Injektion der Zelllinie E1A_{CR3Ex2}123 kam es sogar in drei von fünf Tieren zum Ausbleiben der Tumorbildung. In den Versuchstieren, in denen es nach der Inokulation dieser Zelllinien nach einer Verzögerung gegenüber den Kontrollen dennoch zur Entstehung der Tumoren kam, folgte das Wachstum auch hier, wie bei den anderen Tumoren, einem exponentiellen Verlauf.

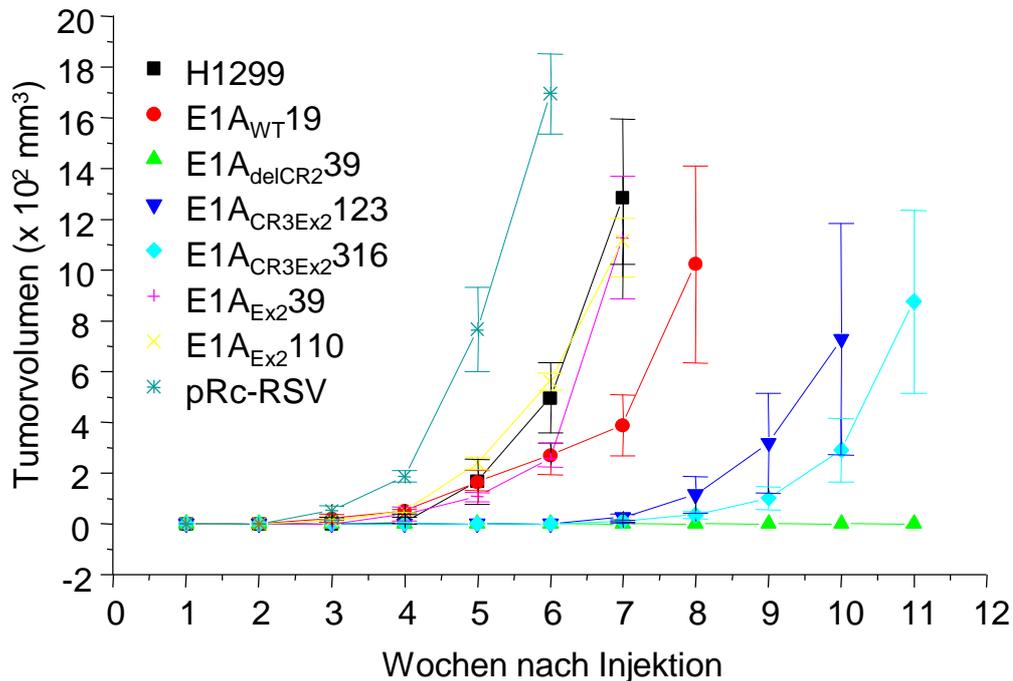


Abb. 19: Tumorigenität der E1A-exprimierenden H1299-Zellen. Es wurden 1×10^7 Zellen in die Flanke von nu/nu Mäusen inokuliert und die Größe der entstehenden Tumore wöchentlich bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm S.E.M. der errechneten Tumolvolumina von jeweils drei Tieren bei den Zelllinien E1A_{delCR2}39, E1A_{Ex2}39, E1A_{Ex2}110 und pRc-RSV, und jeweils fünf Tieren bei den Zelllinien H1299, E1A_{CR3Ex2}123 und E1A_{CR3Ex2}316.

Wie bei den BLM-Zellen (s. Kap. 4.11.1) führte die konstitutive Expression der E1A_{delCR2}- und E1A_{CR3Ex2}-Mutanten zur Reduktion der Tumorigenität der H1299-Zelllinie. Das Ausbleiben bzw. die Verzögerung der Tumorbildung der Zelllinien, die diese Mutanten exprimierten, war dabei nicht auf eine veränderte Proliferationskinetik zurückzuführen (s. a. Kap. 4.9). Es ergab sich ebenfalls kein Zusammenhang zwischen der Expression von Tumormarkern und der Tumorigenität der Zelllinien (s. a. Kap. 4.8). Die Tumorigenitätsstudien zeigten, dass im Besonderen die E1A_{delCR2}- und die E1A_{CR3Ex2}-Mutante in den Zelllinien BLM und H1299 antitumorigene Funktionen hatten.

4.12 Expressionsanalyse der E1A-Proteine in den Tumoren der BLM- und H1299-Zelllinien

Bei der Ausbildung der Tumoren durch die Zelllinien, die das E1A_{delCR2}- oder das E1A_{CR3Ex2}-Konstrukt konstitutiv exprimierten, kam es zu deutlichen Verzögerungen im Vergleich zu den jeweiligen parentalen Zelllinien (Kap. 4.11). Um zu untersuchen, warum es trotz der deutlichen Verlängerung der Latenzzeiten zum Auswachsen von Tumoren kam, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt.

Zunächst wurde die Expression der E1A-Proteine in den entnommenen Tumoren analysiert. Die Abbildung 20 zeigt, dass nur in den Tumoren, die aus E1A_{Ex2}-exprimierenden BLM-Zellen entstanden waren, E1A-Proteine exprimiert wurden. In den anderen untersuchten Tumoren war keine E1A-Expression detektierbar. Der Versuch konnte durch die Untersuchung einer weiteren Reihe von Proteinextrakten aus Tumoren, die sich in anderen Versuchstieren aus den gleichen Zelllinien entwickelt hatten, bestätigt werden.

In den Tumoren der H1299-Zelllinien zeigte sich das gleiche Ergebnis. Ausschließlich die Tumoren, die durch Inokulation der Zellklone E1A_{Ex2}39 und E1A_{Ex2}110 entstanden waren, exprimierten das E1A_{Ex2}-Konstrukt (Daten nicht gezeigt).

Die Western-Blot-Analysen deuten darauf hin, dass die in den Tieren inokulierten Zellpopulationen Subklone bildeten, deren E1A-Expression verloren gegangen war. Diese waren dann möglicherweise nach einem Verzögerungszeitraum in der Lage, zu Tumoren auszuwachsen. Eine weitere Möglichkeit, die die Verzögerung der Tumorbildung hätte bedingen können, besteht darin, dass die Expression der E1A-Proteine durch die Repression des pRc-RSV-Promotors in den Mäusen reduziert war (s. a. Kap. 5.1). Um diese Möglichkeit in Betracht zu ziehen, wurde im Folgenden die Integration der E1A-cDNA in den entnommenen Tumoren analysiert.

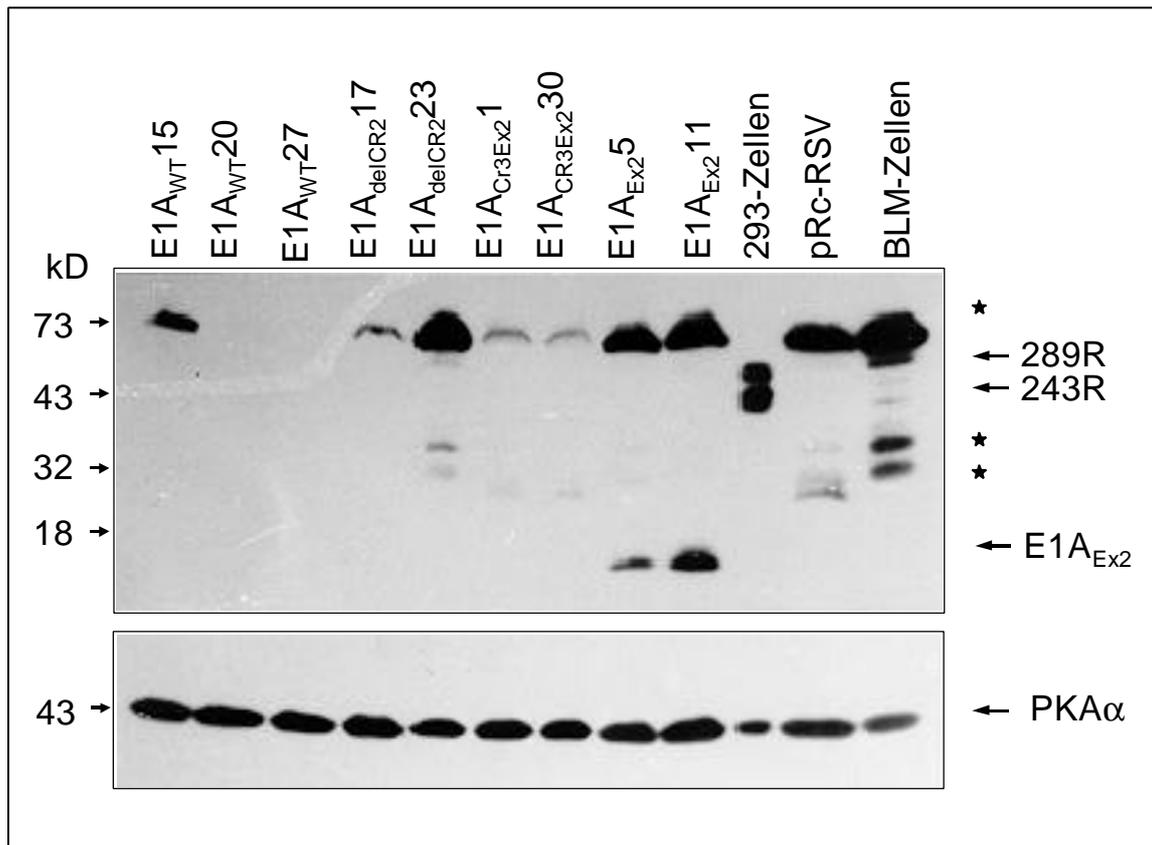


Abb. 20: Untersuchung der E1A-Expression in Proteinextrakten aus Tumorgewebe im Western-Blot. Es wurden 100 μ g Zellextrakt der jeweiligen durch die Inokulation verschiedener E1A-exprimierender BLM-Zelllinien entstandenen Tumoren eingesetzt und die E1A-Expression mittels eines spezifischen Antikörpers analysiert. Die Spuren sind mit den jeweiligen den Tieren inokulierten Zelllinien gekennzeichnet. Als Negativkontrolle diente Extrakt aus Tumoren, die nach Inokulation parentaler BLM-Zellen entstanden (Spur 12), als Positivkontrolle 10 μ g Zellextrakt aus 293-Zellen (Spur 10). Der * kennzeichnet durch den sekundären Antikörper detektierte unspezifische Banden. Die Positionen und Molekulargewichte der im Gel aufgetrennten Proteine sind am linken Bildrand gezeigt. Um sicherzustellen, dass gleiche Mengen an Proteinextrakt aufgetragen wurden, wurde derselbe Blot danach mit einem PKA/ α cat-Antikörper inkubiert.

4.13 Präsenz der E1A-cDNA in Tumoren

Da sich nur in den Tumoren, die durch die Inokulation der E1A_{Ex2}-Zelllinien entstanden waren, die Expression von E1A-Proteinen nachweisen ließ (s. Kap. 4.12), wurde untersucht, ob in den Tumoren, in denen die E1A-Expression nicht mehr nachweisbar war, die transfizierte E1A-cDNA noch präsent war. Dazu wurde eine

PCR mit E1A-spezifischen Primern durchgeführt, bei der die aus den Tumoren extrahierte genomische DNA als Matrize diente.

In der PCR ließ sich aus allen untersuchten Tumoren, die sich aus den ursprünglich E1A-exprimierenden BLM-Zelllinien gebildet hatten, ein E1A-spezifisches Produkt der richtigen Größe nachweisen (Abb. 21). Dies war auch der Fall bei solchen Tumoren, in denen die Expression nicht mehr nachzuweisen war. Dieses hier präsentierte Ergebnis der PCR aus Tumoren der BLM-Zelllinien konnte mit Tumoren der anderen E1A-exprimierenden Zelllinien aus anderen Tieren bestätigt werden.

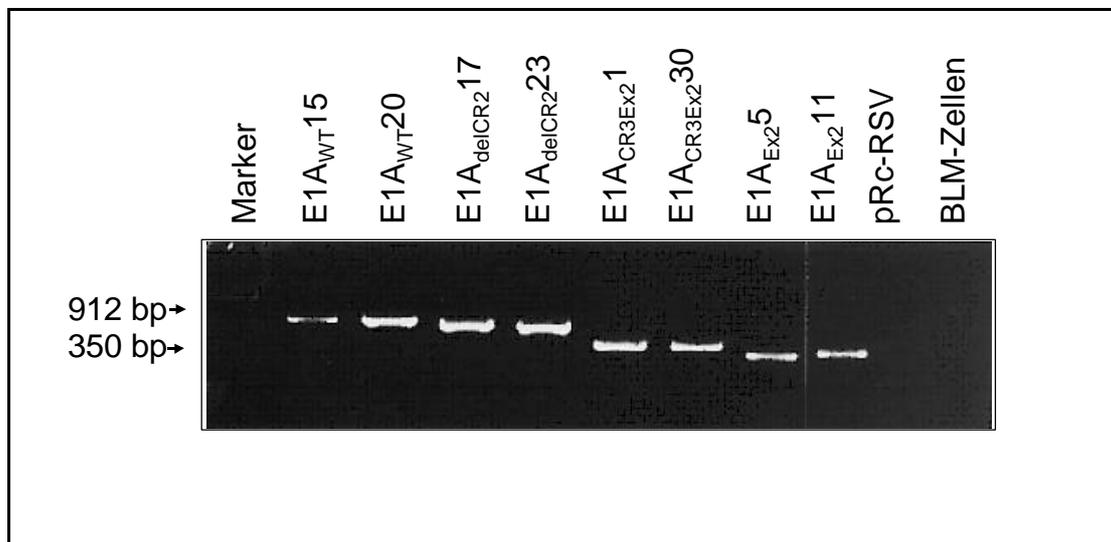


Abb. 21: Überprüfung der Präsenz der E1A-cDNA in genomischer DNA aus Tumoren. Die genomische DNA aus durch Inokulation E1A-exprimierender BLM-Zelllinien entstandenen Tumoren wurde als Matrize in eine PCR mit E1A-spezifischen Primern eingesetzt. Die Abbildung zeigt ein Agarosegel mit den erhaltenen PCR-Produkten aus jeweils einem Tumor. Die Spuren sind mit den jeweiligen den Tieren inokulierten Zelllinien gekennzeichnet.

Die Tatsache, dass die E1A-cDNA in allen untersuchten Tumoren präsent war, gibt einen Hinweis darauf, dass entweder die Repression des RSV-Promotors, darin entstandene Mutationen oder eine posttranslationale Modulation für die fehlende E1A-Expression verantwortlich war.

4.14 Chemosensibilisierung der BLM- und H1299-Zelllinien durch die konstitutive Expression der E1A-Mutanten

Eine bei der Behandlung maligner Erkrankungen immer wieder auftauchende Problematik ist die Resistenzbildung von Tumoren gegenüber Zytostatika und die damit verbundene im Verlauf einer Tumorthherapie einsetzende Unwirksamkeit dieser Behandlung. Viele dieser Substanzen bewirken eine Schädigung der DNA in behandelten Zellen und induzieren dabei die Apoptose (Fritsche *et al.*, 1993). Neben der häufig beschriebenen Induktion von p53-abhängiger Apoptose durch Zytostatika werden auch p53-unabhängige Apoptosemechanismen diskutiert (Sánchez-Prieto *et al.*, 1995; Frisch und Dolter, 1995).

Eine bereits bekannte Funktion der E1A-Proteine ist ihre Fähigkeit, die Zytostatika-Resistenzbildung bei Tumorzellen zu revertieren (Lowe *et al.*, 1993; Frisch und Dolter, 1995; Sánchez-Prieto *et al.*, 1995). Es stellte sich daher die Frage, ob auch die im Zuge dieser Arbeit konstruierten transformationsdefekten E1A-Mutanten in der Lage sind, Tumorzellen für die Behandlung mit den in der Klinik häufig verwendeten Zytostatika Cisplatin und Doxorubicin zu sensibilisieren.

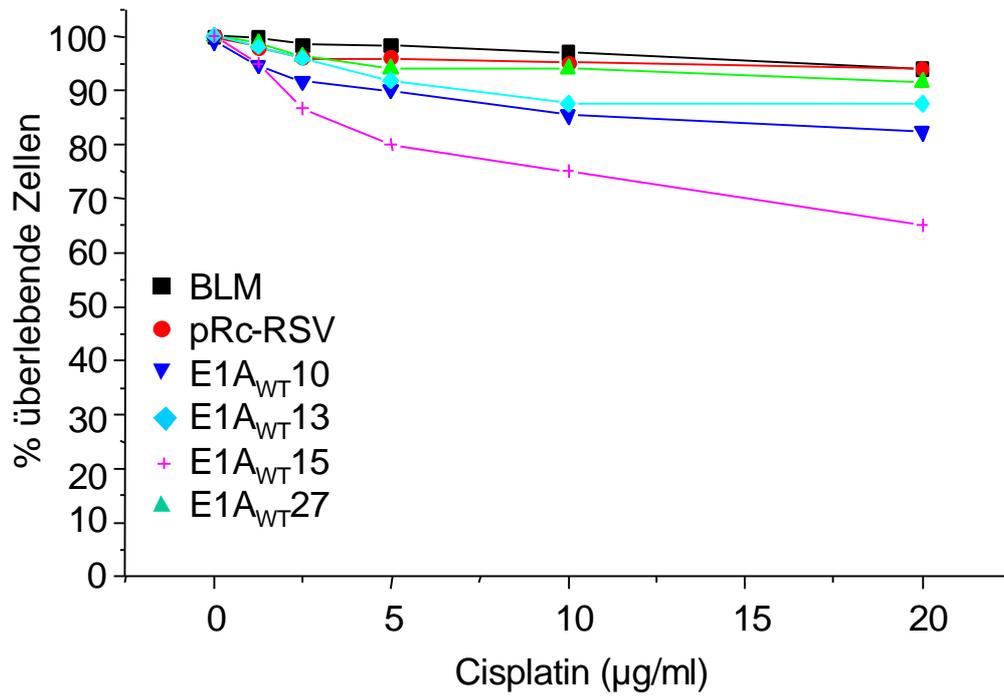
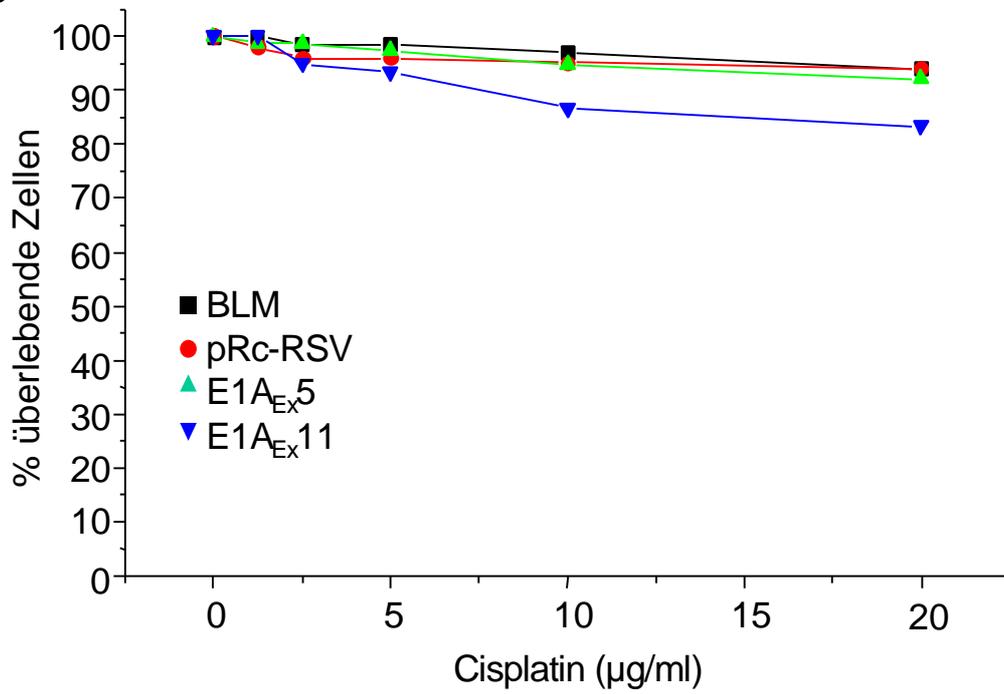
4.14.1 Sensibilisierung gegenüber der Cisplatinbehandlung

Es sollte untersucht werden, ob die konstitutive Expression der E1A-Mutanten in den Zelllinien BLM und H1299 eine Sensibilisierung gegenüber der Cisplatinbehandlung bewirkt. Dazu wurden die Zelllinien über einen Zeitraum von 28 Stunden mit 1 - 20 µg/ml Cisplatin im Medium behandelt und anschließend mittels eines MTT-Tests die relative Anzahl der überlebenden Zellen bestimmt.

Die Abbildungen 22A-D zeigen das Ergebnis für die BLM-Zelllinien. Bei der parentalen Zelllinie überlebten nahezu 100% der behandelten Zellen in einem Bereich der Cisplatinkonzentration zwischen 1 - 20 µg/ml. Auch der in die BLM-Zellen integrierte pRc-RSV-Vektor hatte keinen Einfluss auf die Resistenz gegenüber der Zytostatikabehandlung. Die in diese Analyse eingesetzten E1A_{WT}-Zelllinien reagierten ebenfalls wenig auf die Gabe des Zytostatikums (Abb. 22A). Bei der sensitivsten der E1A_{WT}-exprimierenden Zelllinien, E1A_{WT}15, überlebten ca. 70% der

Zellen die Behandlung mit 20 µg/ml Cisplatin. Die Abb. 22B zeigt, dass auch die beiden E1A_{Ex2}-exprimierenden Zelllinien kaum sensibel auf eine Behandlung reagierten und eine maximale Abnahme der überlebenden Zellen um 10% bei der höchsten eingesetzten Cisplatinkonzentration zeigten. Im Gegensatz dazu waren Zelllinien, die die Mutante E1A_{delCR2} oder E1A_{CR3Ex2} exprimierten, im Vergleich zur parentalen bzw. pRc-RSV-Zelllinie stark sensibilisiert (Abb. 22C und D). Die Zelllinien, die die E1A_{delCR2}- und E1A_{CR3Ex2}-Mutanten exprimierten, sprachen bereits bei der geringsten Cisplatindosierung von 1 µg/ml an. So überlebten bei allen vier untersuchten Zelllinien mit den Mutanten E1A_{delCR2} (Zelllinie 17 und 23) (Abb. 22D) und E1A_{CR3Ex2} (Zelllinie 1 und 30) (Abb. 22C) bei dieser eingesetzten Konzentration nur ca. 60% der Zellen die 28stündige Behandlung. Bei einer Cisplatingabe von 5 µg/ml kam es bei den E1A_{CR3Ex2}-transfizierten Zellen zu einer weiteren Abnahme der überlebenden Zellen um 20 – 30%. Bei den E1A_{delCR2}-transfizierten Zellen überlebten bei dieser Konzentration im Fall der Zelllinie E1A_{delCR2}17 noch ca. 45% der Zellen, bei der Zelllinie E1A_{delCR2}23 nur noch ca. 25%. Bei der höchsten verabreichten Dosis von 20 µg/ml überlebten bei der Zelllinie E1A_{delCR2}17 ca. 30%, bei den drei anderen untersuchten sensitiven Zelllinien nur noch ca. 10 – 20% der behandelten Zellen.

Dies bedeutet, dass die Expression des E1A_{delCR2}- oder E1A_{CR3Ex2}-Konstruktes die BLM-Zellen für die Behandlung mit schon geringen Cisplatinkonzentrationen sensibilisierte.

A**B**

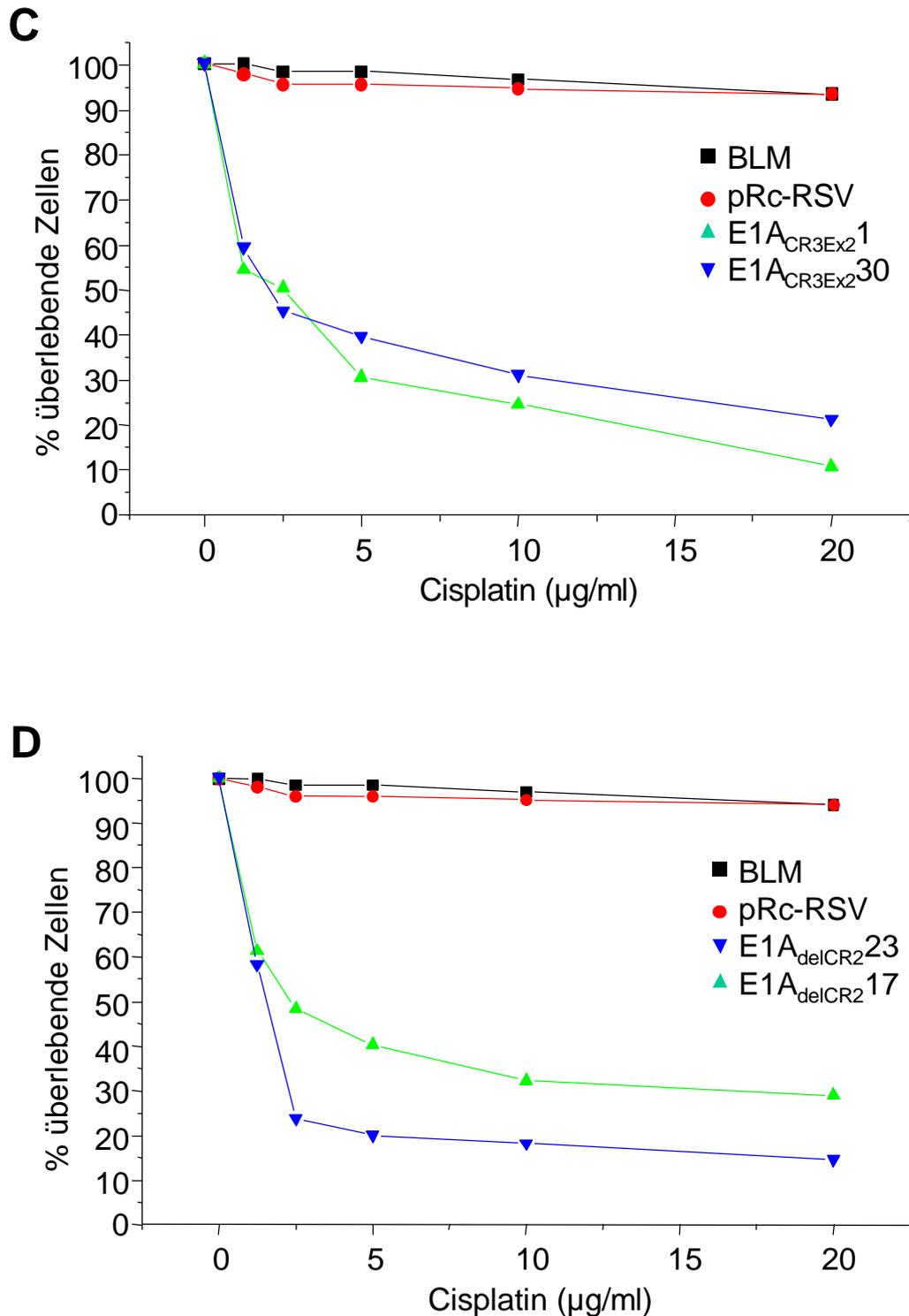


Abb. 22: Untersuchung der Resistenz der BLM-Zellen und ihrer E1A-exprimierenden Derivate gegenüber der Cisplatinbehandlung. Die Abbildungen zeigen die relative Anzahl der überlebenden Zellen in % der jeweiligen Zelllinien nach 28 h Behandlungsdauer mit verschiedenen Cisplatinkonzentrationen eines repräsentativen Versuchsansatzes. **A.** behandelte E1A_{WT}-Zelllinien, **B.** E1A_{Ex2}-Zelllinien, **C.** sensitive E1A_{CR3Ex2}-Zelllinien, **D.** sensitive E1A_{delCR2}-Zelllinien jeweils im Vergleich zu untransfizierter oder pRc-RSV-transfizierter Kontrolle.

Die parentale H1299-Zelllinie reagierte wie die BLM-Zellen über einen Bereich von 1 - 20 µg/ml Cisplatin unsensitiv, d. h. 100% der behandelten Zellen überlebten auch die höchste eingesetzte Cisplatinkonzentration (Abb. 23A). Bei der pRc-RSV-Kontrollzelllinie waren ca. 15% der Zellen bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 20 µg/ml sensitiv. Die beiden H1299-Zelllinien, die ein E1A_{Ex2}-Konstrukt konstitutiv exprimierten (Zelllinie 39 und 110), waren wie die pRc-RSV-Kontrollzelllinie ebenfalls in hohen Cisplatindosierungen um 10 - 20% sensitiver als die parentale Zelllinie. Die Abbildung 23B zeigt das Ergebnis für Zelllinien, die sensitiviert gegenüber der Cisplatinbehandlung sind. Zum Vergleich sind die Überlebensraten der Kontrollzelllinien in der Abbildung dargestellt. Die Zelllinien, in denen die Mutanten E1A_{delCR2} und E1A_{CR3Ex2} exprimiert wurden, zeigten deutliche Unterschiede bezüglich der relativen Anzahl überlebender Zellen ab einer Cisplatinkonzentration von 2,5 µg/ml. Bei einer Steigerung der Cisplatinkonzentrationen im Medium nahm die Anzahl überlebender Zellen kontinuierlich ab. Je nach Zelllinie überlebten 20 – 50% der Zellen die Behandlung mit der höchsten Dosis. Die hier eingesetzte E1A_{WT19}-Linie war in gleichem Maße sensitiv gegenüber Cisplatin wie die Zelllinien, die die Mutanten exprimierten, wobei hier die maximal eingesetzte Dosis zum Absterben von ca. 70% der Zellen führte.

In den H1299-Zellen führte die Expression des E1A_{WT}-Konstruktes und der E1A-Mutanten E1A_{delCR2} und E1A_{CR3Ex2} zur Sensibilisierung gegenüber der Cisplatinbehandlung. Dabei nahm die relative Anzahl der überlebenden Zellen kontinuierlich mit steigenden Cisplatinkonzentrationen im getesteten Konzentrationsbereich ab.

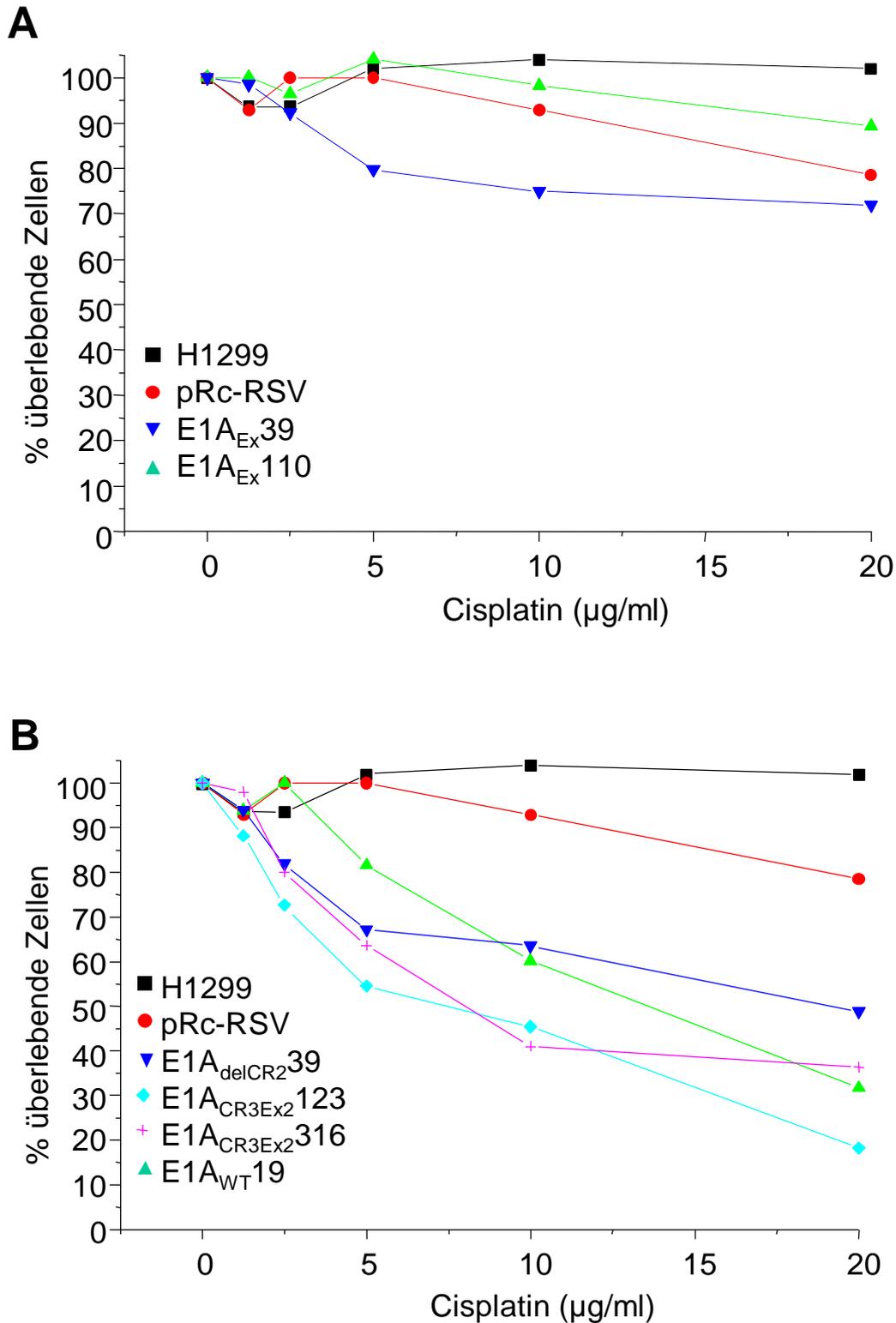
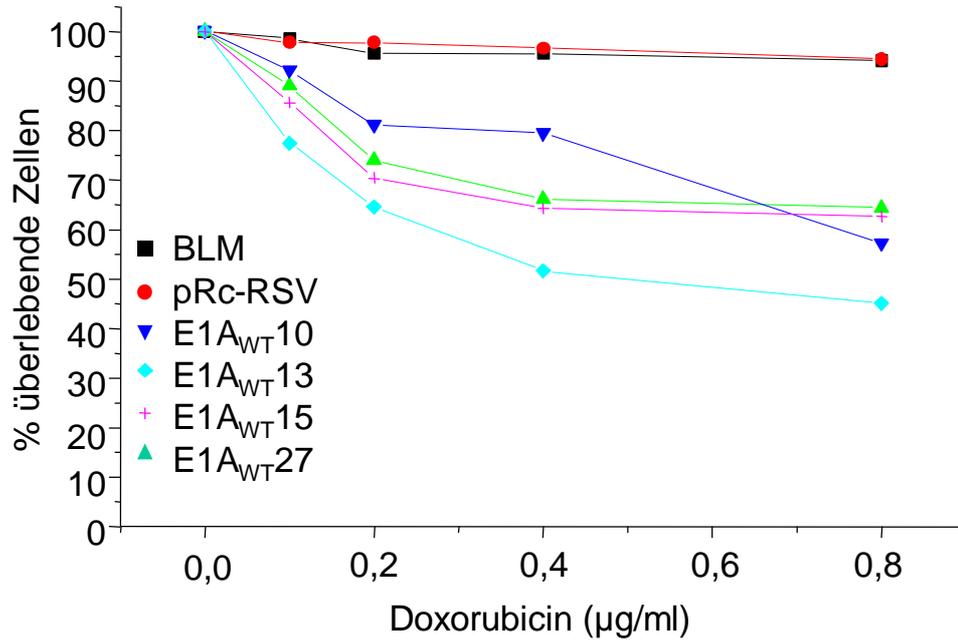
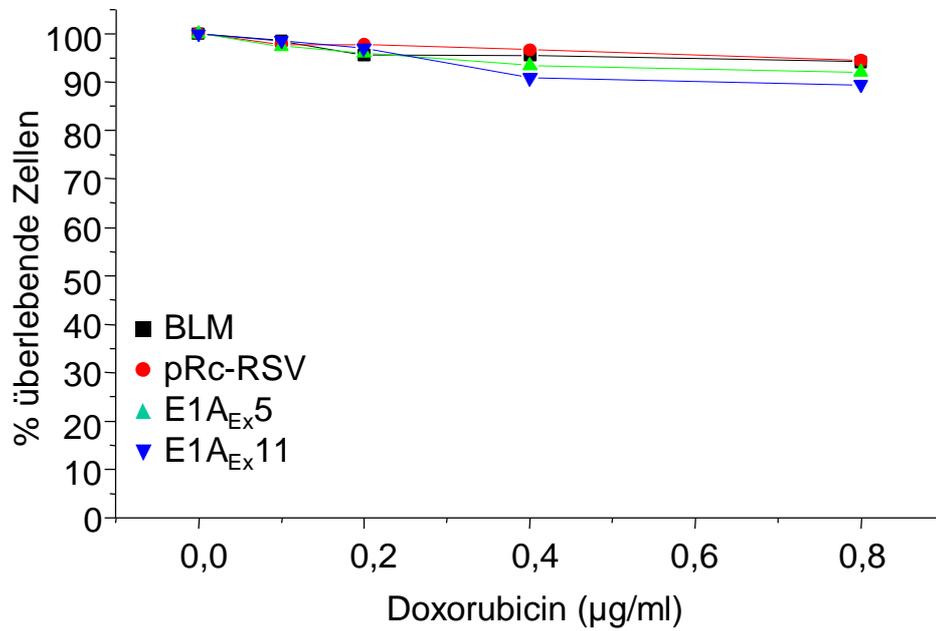


Abb. 23: Untersuchung der Resistenz der H1299-Zellen und ihrer E1A-exprimierenden Derivate gegenüber der Cisplatinbehandlung. Die Abbildungen zeigen die relative Zahl der überlebenden Zellen in % der jeweiligen Zelllinie nach 28 h Behandlungsdauer mit verschiedenen Cisplatinkonzentrationen eines repräsentativen Versuchsansatzes. **A.** unsensitive Zelllinien, **B.** sensitive Zelllinien gegenüber parentaler bzw. pRc-RSV-transfizierter Kontrollen.

4.14.2 Sensibilisierung gegenüber der Doxorubicinbehandlung

Doxorubicin ist neben Cisplatin ein bei der Therapie maligner Erkrankungen häufig eingesetztes Zytostatikum. Um der Frage nachzugehen, ob die E1A-Mutanten auch hier einen sensibilisierenden Effekt haben, wurde der für Cisplatin beschriebene Versuch in gleicher Weise für Doxorubicin durchgeführt und die Prozentzahl der überlebenden Zellen der verschiedenen Zelllinien in Abhängigkeit von der Doxorubicinkonzentration (0,1 - 0,8 µg/ml) im Medium bestimmt.

Die parentale BLM-Zelllinie und die Zelllinie, bei der der pRc-RSV-Vektor integriert war, zeigten im gemessenen Bereich eine deutliche Resistenz (Abb. 24A). Die fünf untersuchten Zelllinien, die das E1A_{WT}-Konstrukt exprimierten, reagierten bei höheren Doxorubicinkonzentrationen sensitiv, so dass bei einer Doxorubicinkonzentration von 0,8 µg/ml zwischen 45 - 70% der Zellen überlebten. Die Expression der Mutante E1A_{Ex2} erbrachte in den beiden untersuchten Zelllinien über den gesamten Bereich der eingesetzten Doxorubicinkonzentrationen keine Sensibilisierung (Abb. 24B). Ein deutlicher Effekt war wiederum bei den Mutanten E1A_{delCR2} und E1A_{CR3Ex2} zu erkennen, deren Expression in den Zelllinien eine Sensibilisierung bereits bei der sehr geringen Konzentration von 0,1 µg/ml Doxorubicin zur Folge hatte. Im Fall der E1A_{delCR2}-Mutante überlebten nur ca. 60% (Abb. 24C), bei der E1A_{CR3Ex2} Mutante nur ca. 50% (Abb. 24D) der behandelten Zellen. Der Einsatz höherer Konzentrationen bis zu 0,8 µg/ml bewirkte eine weitere Abnahme der vitalen Zellen um jeweils ca. 20%.

A**B**

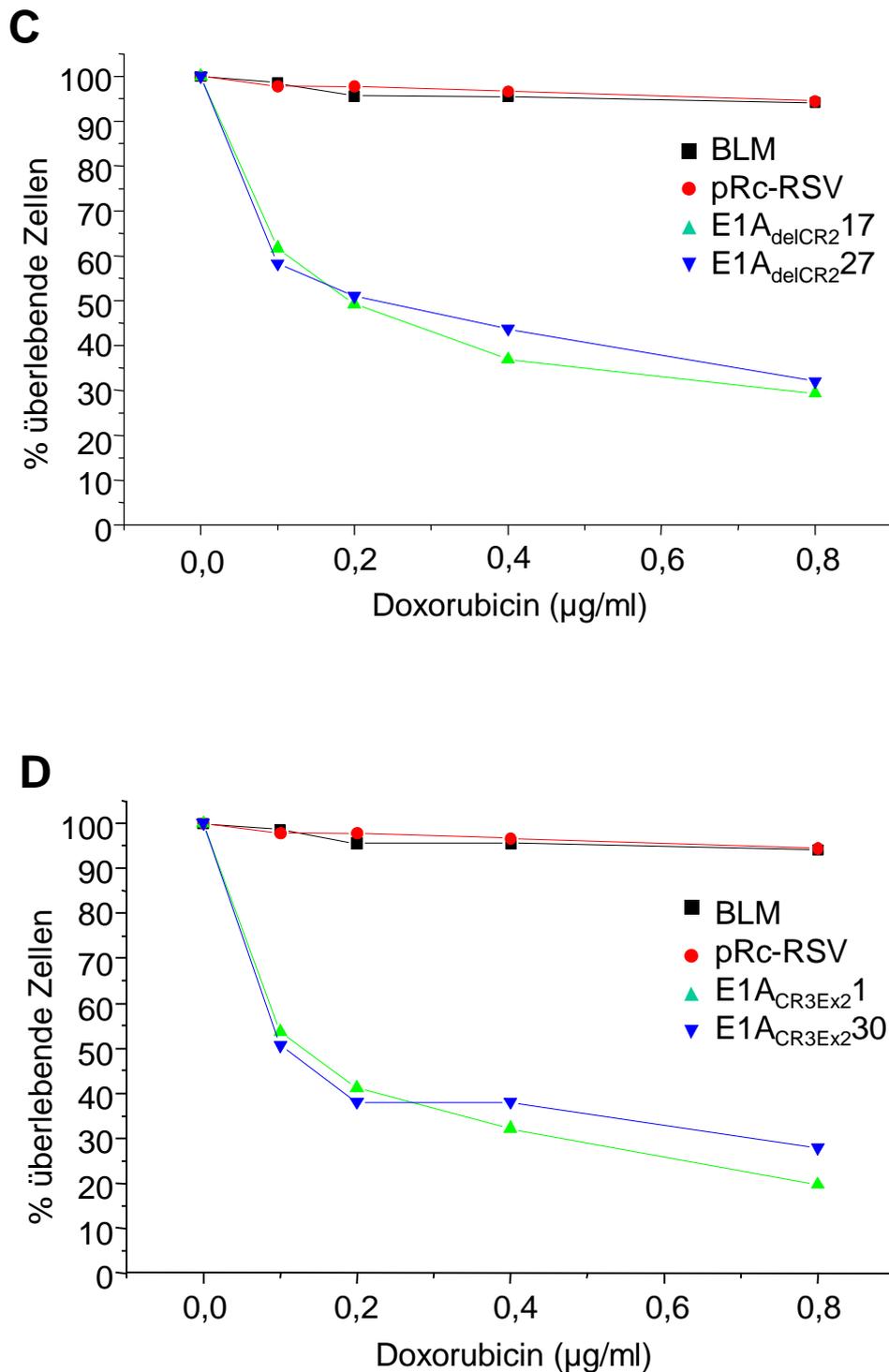
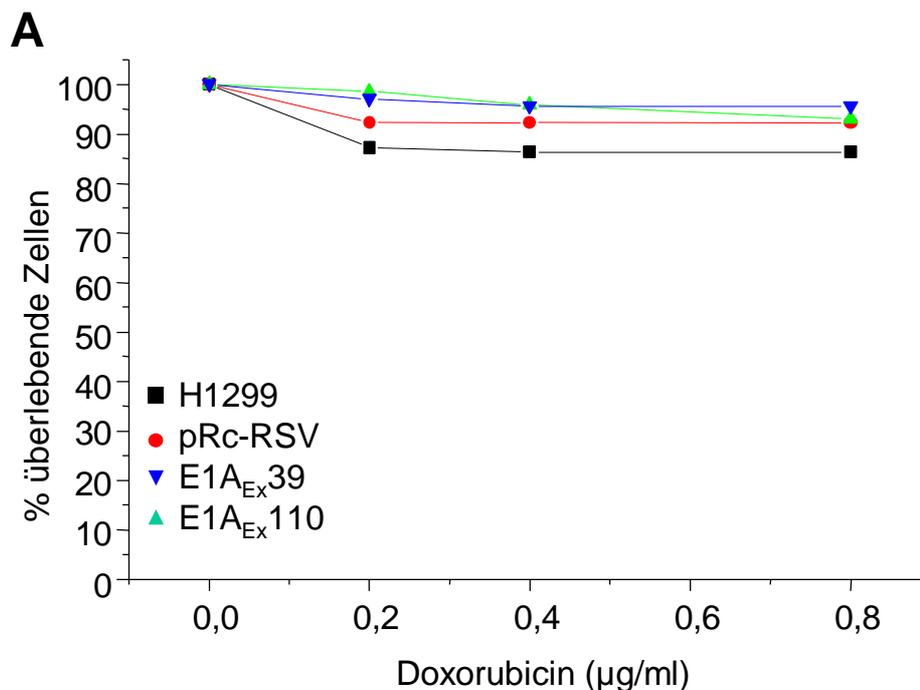


Abb. 24: Untersuchung der Resistenz der BLM-Zellen und ihrer E1A-exprimierenden Derivate gegenüber der Doxorubicinbehandlung. Die Abbildungen zeigen die relative Zahl der überlebenden Zellen in % der jeweiligen Zelllinie nach 28 h Behandlungsdauer mit verschiedenen Doxorubicin-konzentrationen eines repräsentativen Versuchsansatzes. **A.** behandelte E1A_{WT}-Zelllinien, **B.** E1A_{Ex2}-Zelllinien, **C.** sensitive E1A_{delCR2}-Zelllinien, **D.** sensitive

E1A_{CR3Ex2}-Zelllinien jeweils im Vergleich zu parentaler oder pRc-RSV-transfizierter Kontrolle.

Der Einsatz der maximalen Konzentration von 0,8 µg/ml Doxorubicin hatte keinen Einfluss auf die parentale H1299-Zelllinie und die pRc-RSV-Kontrollzelllinie. Bei den Zelllinien mit exprimierenden E1A_{Ex2}-Mutanten zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede zu unbehandelten Zellen (Abb. 25A). Die E1A_{WT19}-Zelllinie war gegenüber der Behandlung mit Doxorubicin sensibilisiert. Bei der höchsten eingesetzten Doxorubicinkonzentration war die Anzahl der überlebenden Zellen gegenüber den Kontrollen um ca. 30% reduziert (Abb. 25B). Auch die Zelllinien, die die beiden Mutanten E1A_{delCR2} und E1A_{CR3Ex2} exprimierten, zeigten eine Sensibilisierung. Hier kam es zur Reduktion der überlebenden Zellen um ca. 30% bei der höchsten Doxorubicinkonzentration im Vergleich zu den Kontrollzelllinien (Abb. 25B).

Eine deutliche Sensibilisierung der H1299-Zellen gegenüber der Doxorubicinbehandlung war somit im Fall der Zelllinien, die ein E1A_{WT}-, E1A_{delCR2}- oder E1A_{CR3Ex2}-Konstrukt exprimierten, zu erkennen.



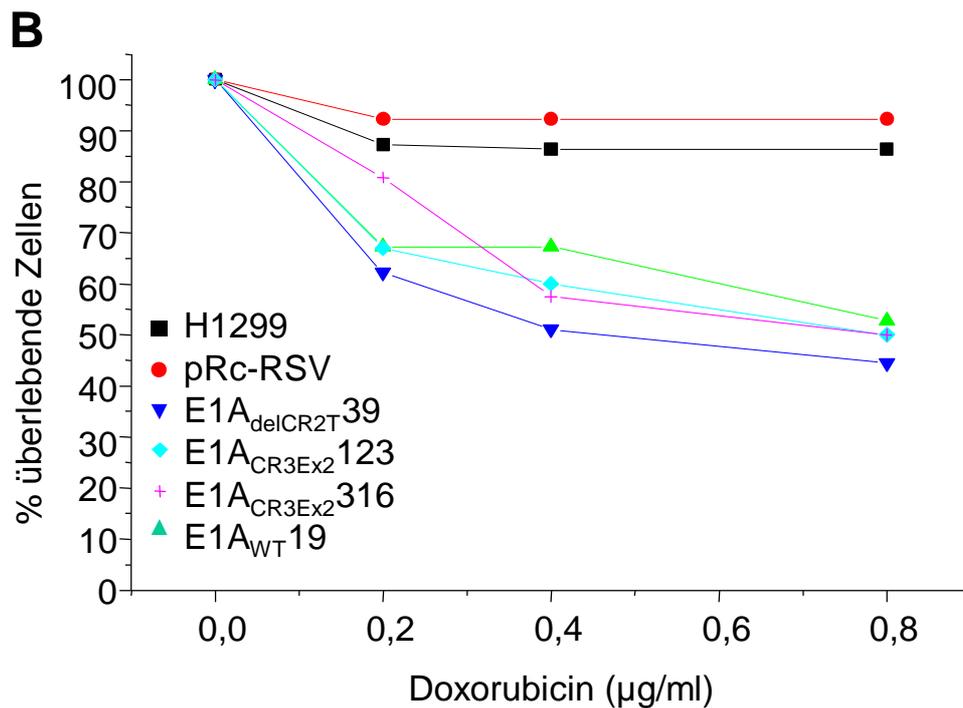


Abb. 25: Untersuchung der Resistenz der H1299-Zellen und ihrer E1A-exprimierenden Derivate gegenüber der Doxorubicinbehandlung. Die Abbildungen zeigen die relative Zahl der überlebenden Zellen in % der jeweiligen Zelllinie nach 28 h Behandlungsdauer mit verschiedenen Doxorubicinkonzentrationen eines repräsentativen Versuchsansatzes. **A.** unsensitive Zelllinien, **B.** sensitive Zelllinien gegenüber parentaler bzw. pRc-RSV-transfizierter Kontrollen.

Die Versuche zeigten, dass im Besonderen die Mutanten E1A_{delCR2} und E1A_{CR3Ex2} in der Lage waren, die beiden Zelllinien BLM und H1299 gegenüber der Behandlung mit den Zytostatika Cisplatin und Doxorubicin zu sensibilisieren (s. a. Kap. 4.13). Die E1A_{WT}-Zelllinien waren nur gegenüber der Behandlung mit Doxorubicin sensibilisiert. Es stellte sich die Frage, ob die Sensibilisierung auf die Induktion von Apoptose zurückzuführen ist.

Im Prozess der Apoptose kommt es unter anderem zu einer charakteristischen Fragmentierung der genomischen DNA (Wyllie, 1980). In ersten Analysen zeigten die E1A-exprimierenden BLM-Zellen 24 h nach Behandlung mit den Zytostatika keine DNA-Fragmentierung. Bei den H1299-Zelllinien war zwar ein Abbau von DNA zu erkennen, dabei handelte es sich jedoch nicht um eine für die Apoptose typische Fragmentierung der DNA. Dies bedeutet, dass möglicherweise außer der Apoptose

andere Mechanismen, z. B. Nekrose bei der Sensibilisierung der hier untersuchten Zelllinien durch die E1A-Mutanten E1A_{delCR2} und E1A_{CR3Ex2} eine Rolle spielen könnten (s. a. Kap. 5.2).

4.15 Metastasierungspotential der E1A-exprimierenden BLM- und H1299-Zelllinien

Eine bereits für E1A-Proteine beschriebene Fähigkeit ist die Repression des Metastasierungspotentials von Tumorzelllinien (Tackeichi, 1993; Frisch, 1994; Offringa *et al.*, 1988). Mit den hier vorliegenden Versuchen der Invasion, der Aktivität der MMP-2 und der Aktivierung von KAI1 wurde untersucht, ob auch die E1A-Mutanten die Metastasierung effektiv supprimieren können.

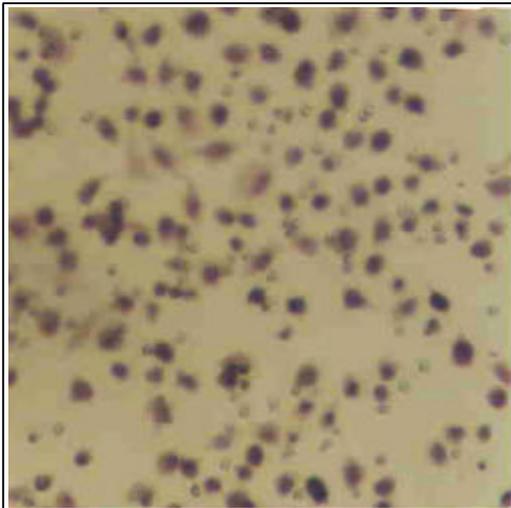
4.15.1 Überprüfung der Invasivität der E1A-exprimierenden BLM- und H1299-Zellen

Die Fähigkeit von Tumorzellen durch eine matrixbeschichtete Membran zu invadieren, korreliert häufig mit dem Metastasierungspotential dieser Zellen (de Both *et al.*, 1999). Die in den Matrigel-Test eingesetzte, vornehmlich aus Kollagenen bestehende Matrix besitzt Ähnlichkeiten mit der ECM. Diese muss von den aus dem soliden Tumor auswandernden Zellen bei der Metastasierung überbrückt werden (Ahmad und Hart, 1997). Es wurde hier untersucht, ob die E1A-exprimierenden Zellen weiterhin die Fähigkeit besaßen, eine solche Matrix zu invadieren.

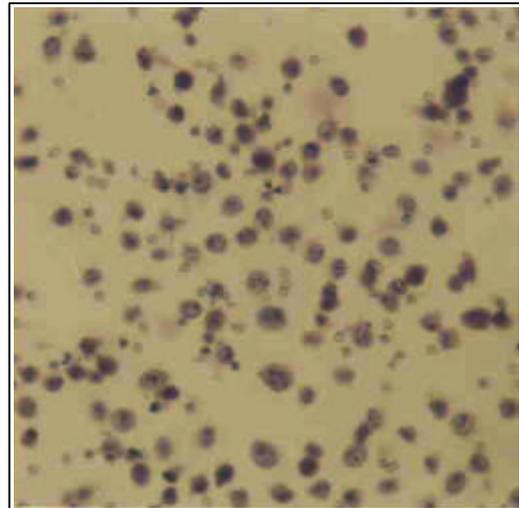
Dazu wurden die Zelllinien auf einer matrixbeschichteten Membran ausgesät und nach 24 Stunden die Anzahl der die Membran passierten Zellen abgeschätzt. In diesem Zeitraum waren ca. 90% der Zellen der parentalen BLM-Zelllinie und der pRc-RSV-Kontrollzelllinie durch die matrixbeschichtete Membran gewandert. Die in diesen Versuch eingesetzten E1A-exprimierenden Zelllinien zeigten Unterschiede in ihrem Invasionsverhalten. Im Fall der E1A_{WT}10-Zelllinie hatten nach 24 Stunden sehr wenige Zellen die matrixbeschichtete Membran invadiert. Die anderen E1A_{WT}-exprimierenden Zelllinien zeigten keine Unterschiede im Vergleich zur BLM-Zelllinie (Daten nicht gezeigt). Im Falle der E1A_{delCR2}-exprimierenden Zellen zeigte eine der

beiden Zelllinien eine Verminderung der durch die Membran durchgetretenen Zellen. Bei beiden untersuchten $E1A_{CR3Ex2^-}$ -Zelllinien kam zu einer über 50%igen Reduktion der Anzahl durchgewanderter Zellen gegenüber der parentalen Zelllinie. Die Zellen, die das $E1A_{Ex2^-}$ -Konstrukt exprimierten, zeigten eine mit der parentalen BLM-Zelllinie vergleichbare Invasion durch die matrixbeschichtete Membran. Auch in den Derivaten der H1299-Zelllinie waren veränderte Eigenschaften in Bezug auf die Fähigkeit zur Invasion zu verzeichnen. Bei der $E1A_{delCR2}36$ -Zelllinie zeigte sich eine Reduktion der Anzahl invadierteter Zellen. Bei den Zelllinien, die entweder ein $E1A_{CR3Ex2^-}$ oder ein $E1A_{Ex2^-}$ -Konstrukt exprimierten, war jeweils in einer Zelllinie die Anzahl durch die Membran gewandelter Zellen reduziert, aber in der jeweils anderen ergaben sich keine Unterschiede im Vergleich zur parentalen Zelllinie (Daten nicht gezeigt).

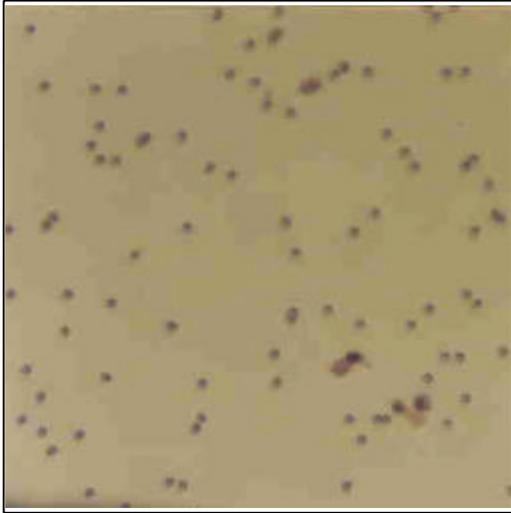
BLM-Zellen



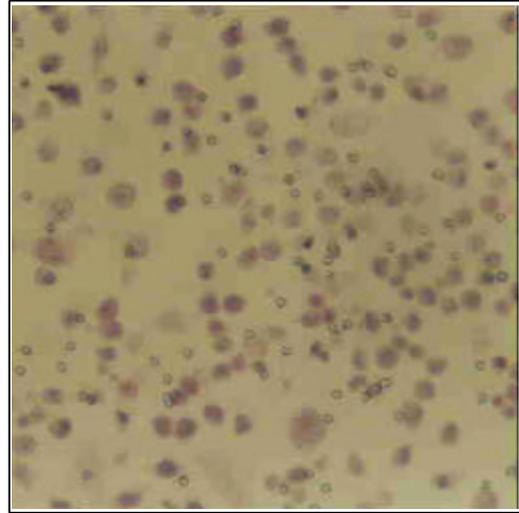
pRc-RSV



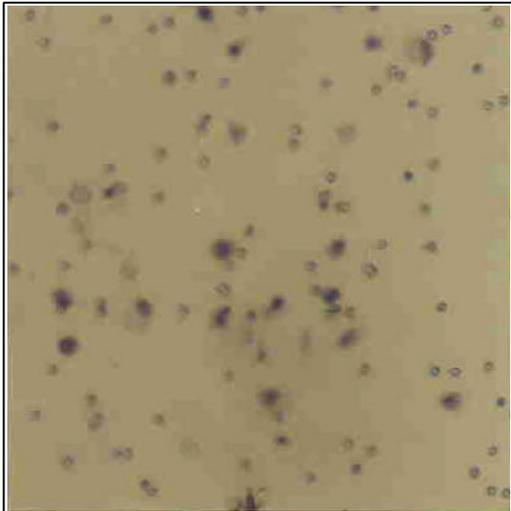
E1A_{WT} 10



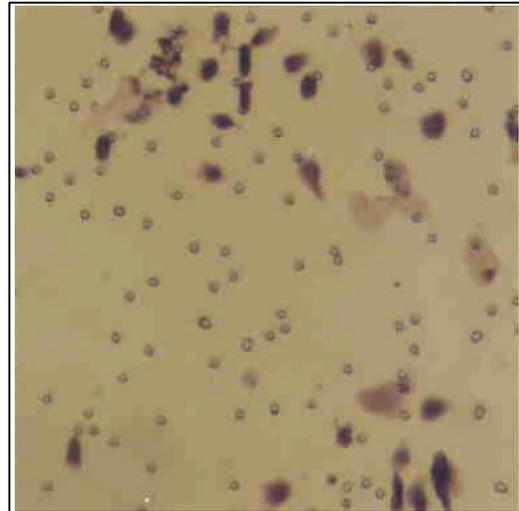
E1A_{delCR2} 17



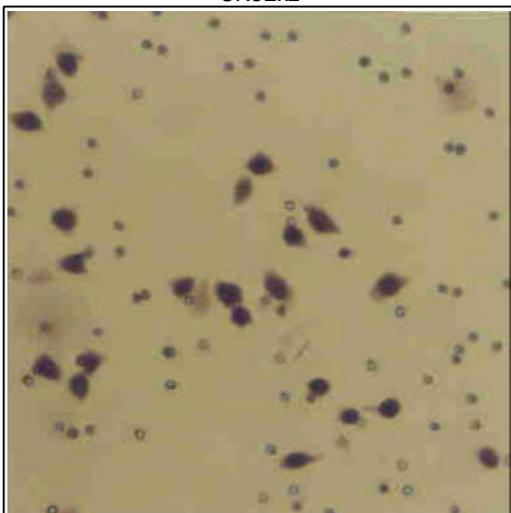
E1A_{delCR2} 23



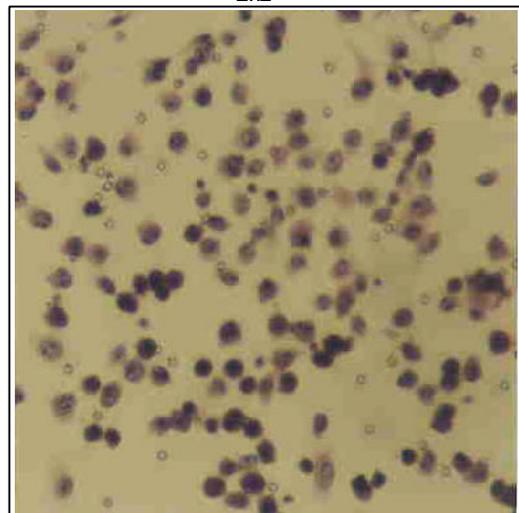
E1A_{CR3Ex2} 1



E1A_{CR3Ex2} 30



E1A_{Ex2} 5



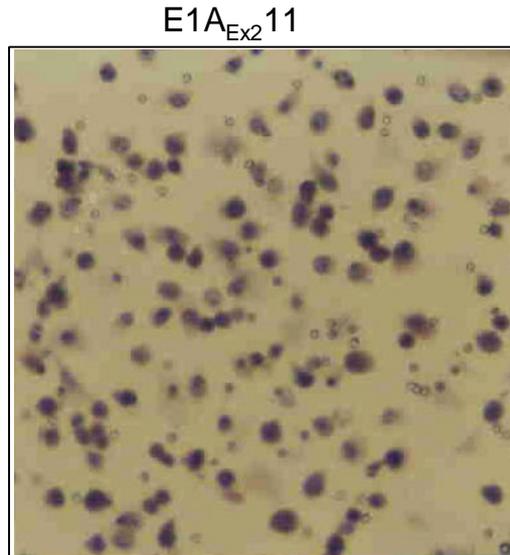


Abb. 26: Invasivität der E1A-exprimierenden BLM-Zelllinien. Die durch die Membran invadierten Zellen wurden 24 h nach Aussaat fixiert und gefärbt. Anschließend wurde die Membran bei 400facher Vergrößerung fotografiert.

Die reduzierte Fähigkeit durch eine matrixbeschichtete Membran zu invadieren, konnte zwar bei einigen Zelllinien beobachtet werden, allerdings konnten diese Veränderung nicht immer auf die Expression eines bestimmten E1A-Konstruktes zurückgeführt werden. Nur bei der E1A_{CR3Ex2}-Mutante ergab sich ein Zusammenhang zwischen ihrer konstitutiven Expression in zwei unabhängigen BLM-Zelllinien und der Verminderung der Invasionsfähigkeit dieser Zellen.

4.15.2 Aktivität der Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) in E1A-exprimierenden BLM-Zellen

Bei der Fähigkeit zur Metastasierung spielen die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) eine wichtige Rolle. Die Sezernierung aktiver Proteinasen, wie der MMP-2, befähigt unter anderem Tumorzellen dazu, durch die sie umgebende Matrix zu wandern, einem wichtigen Schritt bei der Bildung von Metastasen (Mignatti und Rifkin, 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Expression der E1A-Proteine zur Reduktion aktiver MMP-2 in der hoch metastasierenden Zelllinie BLM führt. Dazu wurden Zymogramme mit konditioniertem Zellkulturmedium der BLM-Zelllinien

hergestellt, wobei die sezernierte aktive MMP-2 Gelatine spaltet. Die Abbildung 27 zeigt exemplarisch einen von drei unabhängigen Versuchen, in dem eine starke Aktivität von sezerniertem MMP-2 aus BLM-Zellen im Gegensatz zu nicht metastasierenden F9-Zellen nachzuweisen war. Die untersuchten E1A_{WT}-exprimierenden BLM-Zellen zeigten gegenüber der parentalen Zelllinie keine Verminderung der sezernierten aktiven MMP-2. Im Gegensatz dazu befanden sich im Mediumüberstand der Zelllinien, die die Mutanten E1A_{delCR2} und E1A_{CR3Ex2} exprimierten, weniger aktive Proteasen. Die Aktivität der MMP-2 erreichte in diesen Zelllinien beinahe die Kontrollwerte der F9-Zellen.

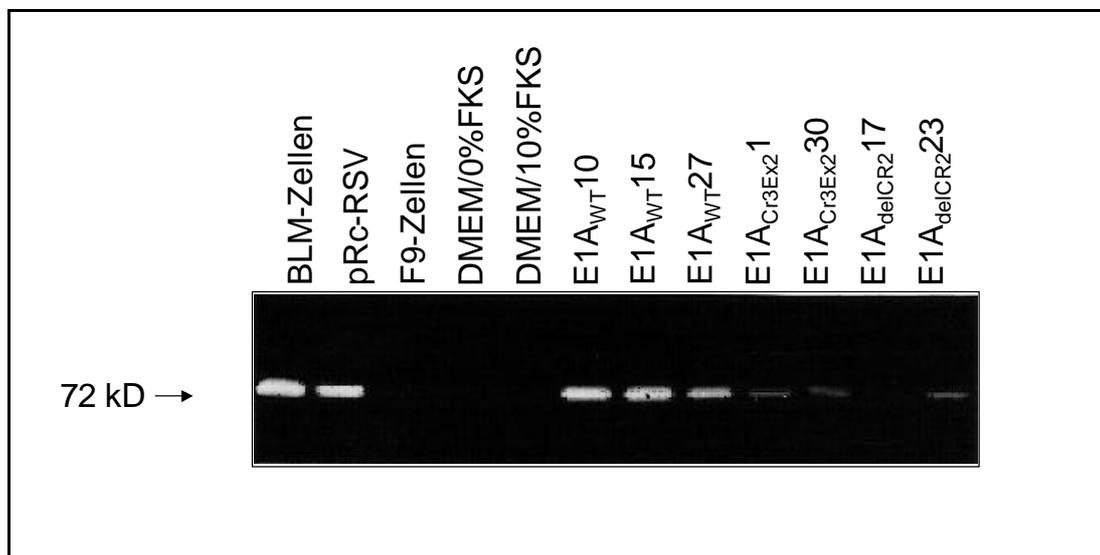


Abb. 27: Untersuchung der Aktivität der MMP-2 in der parentalen und den E1A-exprimierenden BLM-Zelllinien. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis einer Zymographie, bei der der konditionierte serumfreie Mediumüberstand von 1×10^4 Zellen der gekennzeichneten Zelllinien eingesetzt wurde. Als Kontrolle für eine nicht metastasierende Zelllinie dienten F9-Zellen. Als Kontrolle für die residuale Aktivität von MMP-2 im Serum diente nicht konditioniertes Medium (siehe dazu Kap. 3.15.6.).

Die Mutanten E1A_{delCR2} und E1A_{CR3Ex2} waren in der Lage, die Aktivität der MMP-2 als ein Beispiel für eine metastasierungsrelevante Protease zu inhibieren. Für die Repression der MMP-2-Aktivität war die Expression der E1A_{CR3Ex2}-Mutante bereits hinreichend (s. Kap. 5.3).

4.15.3 Expression des Metastasierungssuppressors KAI1

KAI1 ist ein Transmembranprotein, das mit der Fähigkeit zur Metastasierung in Zusammenhang gebracht wird (Sun *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1997), dessen Funktion aber bisher unbekannt ist. Die transiente Expression dieses Proteins führte zu einer Reduktion des Metastasierungspotentials von Kolonkarzinomzelllinien (Takaoka *et al.*, 1998).

Es wurde untersucht, ob die Expression der E1A-Konstrukte in den hier untersuchten Zelllinien möglicherweise einen Einfluss auf die Expression von KAI1 hat. Dazu wurde KAI1 mit einem spezifischen Antikörper im Western-Blot entweder in Extrakten der konstitutiv E1A-exprimierenden Zelllinien oder der mittels Elektroporation transient E1A-transfizierten Zellen nachgewiesen.

In den BLM-Zellen ließ sich ein Protein der richtigen Größe nachweisen, allerdings hatte die Expression der E1A-Proteine, weder bei der transienten Expression noch bei der konstitutiven Expression der E1A-Mutanten der hier untersuchten Zelllinien einen Einfluss auf die Expression von KAI1 (Daten nicht gezeigt).

In den konstitutiv E1A-exprimierenden H1299-Zelllinien war ebenfalls keine Veränderung der Expression von KAI1 zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt). Die transiente Expression der E1A-Konstrukte in H1299-Zellen führte dagegen zu einer Regulation der KAI1-Expression (Abb. 28). So waren die beiden Konstrukte E1A_{WT} und E1A_{delCR2} in der Lage, eine deutliche Steigerung der KAI1-Proteinmenge im Vergleich zu pRc-RSV und untransfizierten Zellen zu induzieren. Die Expression des E1A_{CR3EX2} und des E1A_{EX2}-Konstrukts führte jeweils zu einer Aktivierung der KAI1-Expression, die jedoch geringer war als bei den anderen E1A-Konstrukten. Die E1A-Expression wurde anhand des selben Blots analysiert, um auszuschließen, dass eine unterschiedliche Expression der E1A-Konstrukte die Veränderung der KAI1-Expression zur Folge hatte.

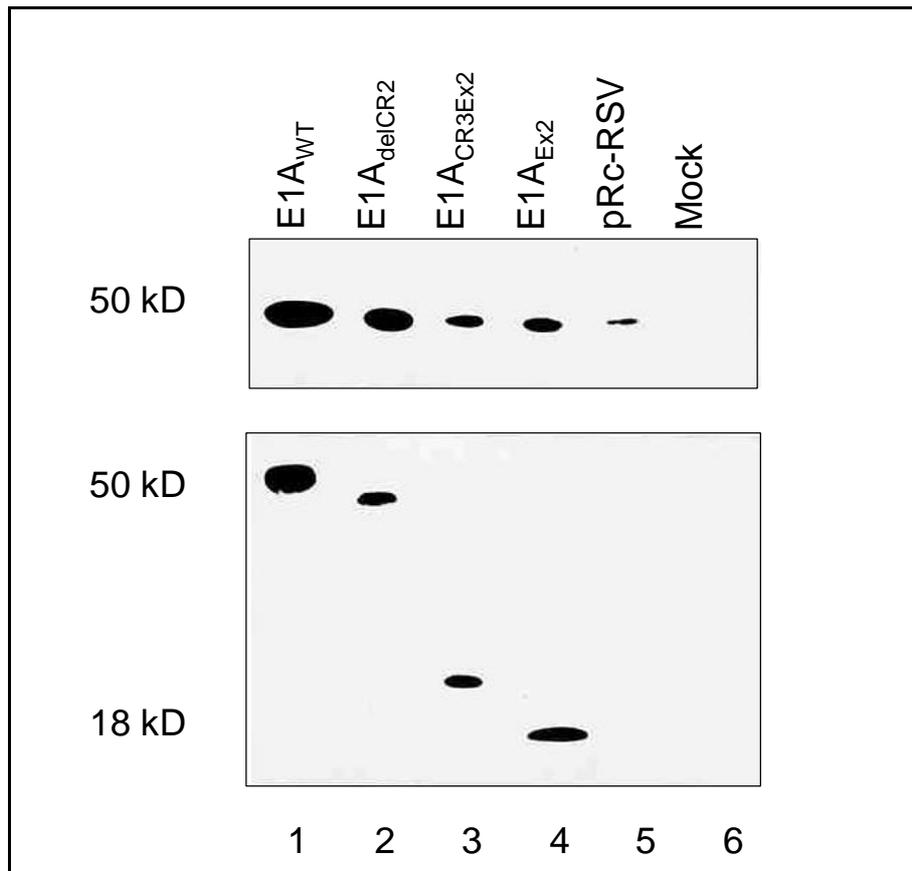


Abb. 28: Expression von KAI1 in mit den E1A-Konstrukten transient transfizierten H1299-Zellen. Die gekennzeichneten E1A-Konstrukte wurden mittels Elektroporation in H1299-Zellen transfiziert und die Zellen 48 h nach Transfektion geerntet. Es wurden 30 µg Protein der transfizierten Zellen in einen Western-Blot eingesetzt und die KAI1- und die E1A-Expression mit jeweils spezifischen Antikörpern analysiert. Es wurden Proteinextrakte aus E1A-transfizierten (Spur 1-4), pRc-RSV-transfizierten (Spur 5) und Mock-transfizierten (Spur 6) H1299-Zellen eingesetzt.

Mit den transienten Expressionsanalysen konnte gezeigt werden, dass die Expression der Konstrukte E1A_{WT} und E1A_{delCR2} in den H1299-Zellen einen Anstieg der KAI1-Expression zur Folge hatte. Gleichzeitig war aber die Expression der Mutante E1A_{Ex2} für die Induktion der KAI1-Expression hinreichend. Die Tatsache, dass zwar nach der transienten Transfektion der E1A-Konstrukte, die Expression von KAI1 induziert werden konnte, aber in den stabil E1A-exprimierenden Zelllinien keine Modulation der KAI1-Expression zu verzeichnen war, deutet darauf hin, dass in den konstitutiv E1A-exprimierenden Zelllinien eine Selektion gegen diese E1A-Funktion stattgefunden hatte (s. Kap. 5.1).

4.16 Einfluss der Expression E1A-Konstrukte auf die transkriptionelle Regulation des *p53*-Gens

E1A-Proteine sind in der Lage, die *p53*-abhängige Apoptose zu induzieren (White, 1993; Bayley und Mymryk, 1994). Dabei ist vor allen Dingen die Stabilisierung von *p53* durch E1A-Proteine von Bedeutung (Nakajima *et al.*, 1998). In Tumoren, in denen *p53* intakt ist, können E1A-Proteine über diesen Mechanismus eine wichtige Tumorsuppressorfunktion ausüben. Aufgrund der Fähigkeit der E1A-Proteine zur Transkriptionsregulation, wäre es aber auch denkbar, dass die *de-novo*-Synthese von *p53* durch E1A-Proteine bei der Suppression *p53*-intakter Tumore eine Rolle spielen könnte. Daher wurde in transienten Expressionsstudien die Rolle der E1A-Konstrukte auf die transkriptionelle Kontrolle des *p53*-Gens untersucht. Es wurde der humane *p53*-Promotor, der vor ein Luciferase-Reportergen kloniert war, mit den entsprechenden E1A-Konstrukten in A549-Zellen kotransfiziert und die Aktivität des Promotors im Luciferase-Assay bestimmt (Abb. 29).

Kotransfektion des E1A_{WT}-Konstruktes und des *p53*-pGL2-Luciferase-Reportergens führte zu dessen 2,5fachen Aktivierung. Die Deletion der CR2 im E1A_{delCR2} Konstrukt hatte keinen Einfluss auf die Aktivierungsfähigkeit des *p53*-Promotors gegenüber dem E1A_{WT}-Konstrukt. Die Mutante E1A_{CR3Ex2} besaß dagegen keine Aktivierungsfunktion im Vergleich zum pRc-RSV-Vektor. Auch die Mutante E1A_{Ex2} war nicht mehr in der Lage, den *p53*-Promotor zu aktivieren.

Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass für die Transaktivierung des *p53*-Promotors der N-Terminus und die CR1 notwendig ist. Dies wiederum lässt vermuten, dass die Rekrutierung der zellulären Kofaktoren p300/CBP für die E1A-vermittelte Transaktivierung von Wichtigkeit ist (s. Kap. 5.4).

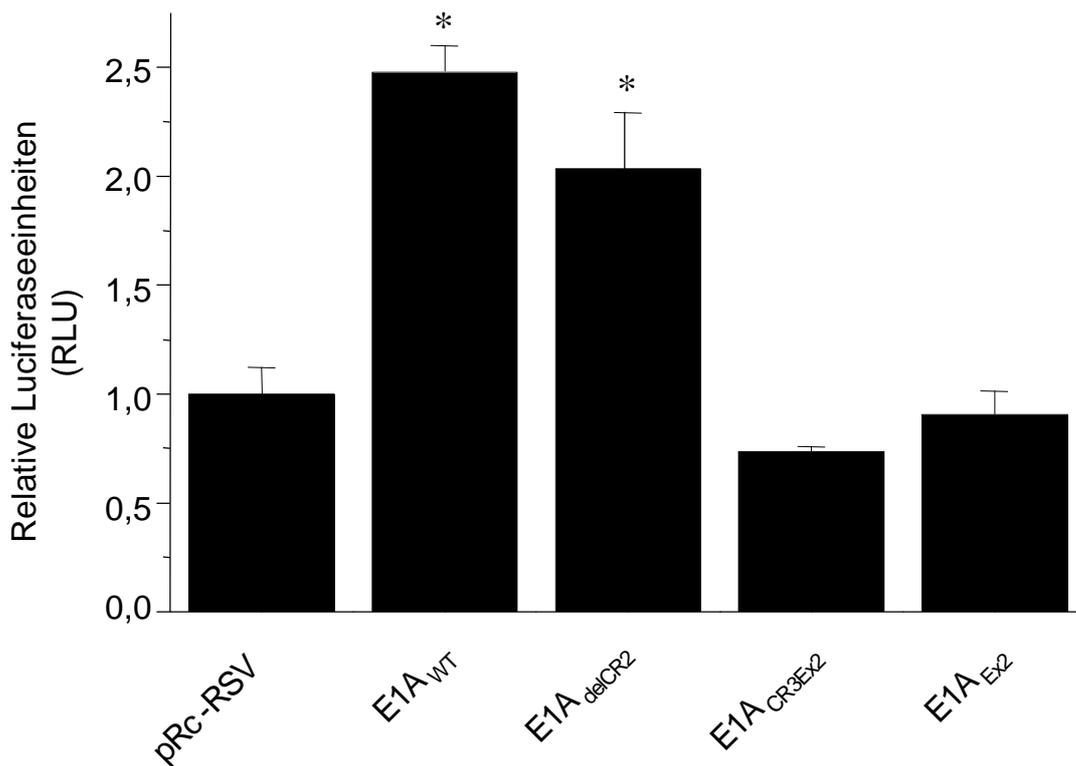


Abb. 29: Aktivierung des *p53*-Promotors durch die E1A-Konstrukte in A549 Zellen. Die E1A-Konstrukte im pRc-RSV-Vektor oder der pRc-RSV-Leervektor wurden mit dem *p53*-Luciferase-Reporterkonstrukt in A549-Zellen kotransfiziert und 48 h nach Beginn der Transfektion die Aktivität des Promotors bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte +S.E.M. relativer Luciferaseeinheiten aus einer Doppelbestimmung, wobei die mittlere RLU des pRc-RSV-Vektors auf 1 normiert wurde. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Versuches. Der * zeigt signifikante Unterschiede im Vergleich zur pRc-RSV-Kontrolle bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ an.

4.17 Einfluss der Expression der E1A-Konstrukte auf die transkriptionelle Kontrolle des *hTERT*-Gens in BLM- und H1299-Zellen

Die Funktion der katalytischen Untereinheit der Telomerase (*hTERT*) garantiert durch die Addition von Nukleotidwiederholungen an Telomere karyotypische Stabilität und kompensiert somit den Verlust von DNA bei der Replikation. Die Abwesenheit der Telomerase geht mit einer Verkürzung der Telomere einher und hat das Einsetzen der Seneszenz der Zelle zur Folge (Harley *et al.*, 1990). Dies kann daher auch als Tumorsuppressor-Mechanismus angesehen werden. Eine stark erhöhte

Telomeraseaktivität ist in verschiedenen Tumorzellen nachgewiesen worden. Sie verhindert somit die allmähliche Verkürzung der Telomere und die damit verbundene Einschränkung für die Lebensdauer einer Zelle (Meyerson *et al.*, 1997). Es wäre für die Therapie maligner Erkrankungen somit eine Möglichkeit, einen geeigneten Telomeraseinhibitor anzuwenden. Es war daher von Interesse, den Einfluss der E1A-Proteine auf die Aktivität der Telomerase zu untersuchen.

Da die Aktivität der Telomerase in Zellen hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene reguliert wird (Nakayama *et al.*, 1998), wurde der *hTERT*-Promotor, der vor ein Luciferase-Reportergen kloniert war, mit den entsprechenden E1A-Konstrukten in H1299- und BLM-Zellen kotransfiziert und die Aktivität des Promotors mit dem Luciferasereporter gen bestimmt.

In der BLM-Zelllinie kam es durch das E1A_{wt}-Protein zu einer mehr als 2,5fachen Aktivierung des *hTERT*-Promotors (Abb. 30). Auch die Mutante E1A_{delCR2} konnte den Promotor aktivieren. Die beiden Mutanten E1A_{CR3Ex2} und E1A_{Ex2} waren nicht in der Lage, die Promotoraktivität zu beeinflussen.

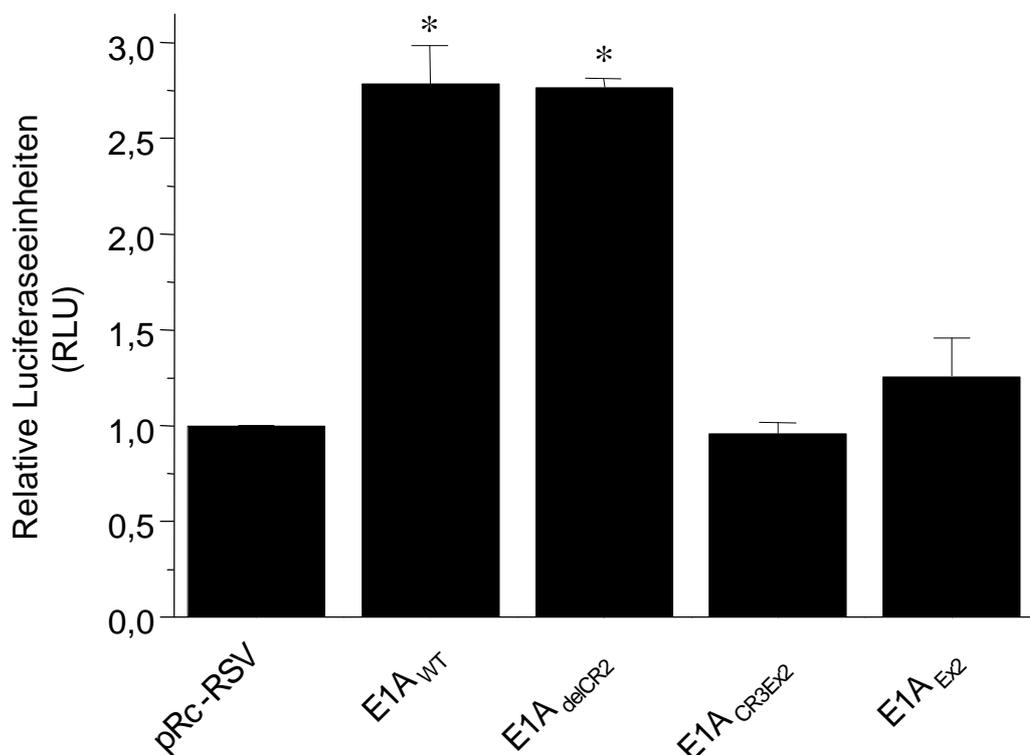


Abb. 30: Aktivierung des *hTERT*-Promotors durch die E1A-Konstrukte in BLM-Zellen. Die E1A-Konstrukte oder der pRc-RSV-Leervektor wurden mit dem *hTERT*-Luciferase-Reporterkonstrukt in BLM-Zellen kotransfiziert und 48 h nach Beginn der

Transfektion die Aktivität des Promotors gemessen. Die Werte sind Mittelwerte +S.E.M. relativer Luciferaseeinheiten aus einer Doppelbestimmung, wobei die mittlere RLU des pRc-RSV-Vektors auf 1 normiert wurde. Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Versuches. Der * zeigt signifikante Unterschiede im Vergleich zur pRc-RSV-Kontrolle bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ an.

Die Expression der E1A-Konstrukte führte in den H1299-Zellen zu einer anderen Modulation der *hTERT*-Promotoraktivität als in den BLM-Zellen (Abb. 31). Das E1A_{WT}-Konstrukt, wie auch die E1A_{delCR2}-Mutante, konnten den *hTERT*-Promotor nicht mehr aktivieren, sondern zeigten eher eine schwache Repression. Die Mutante E1A_{CR3Ex2} verhielt sich wie die pRc-RSV-Kontrolle, während das E1A_{Ex2}-Konstrukt sogar eine geringfügige Aktivierung bewirkte.

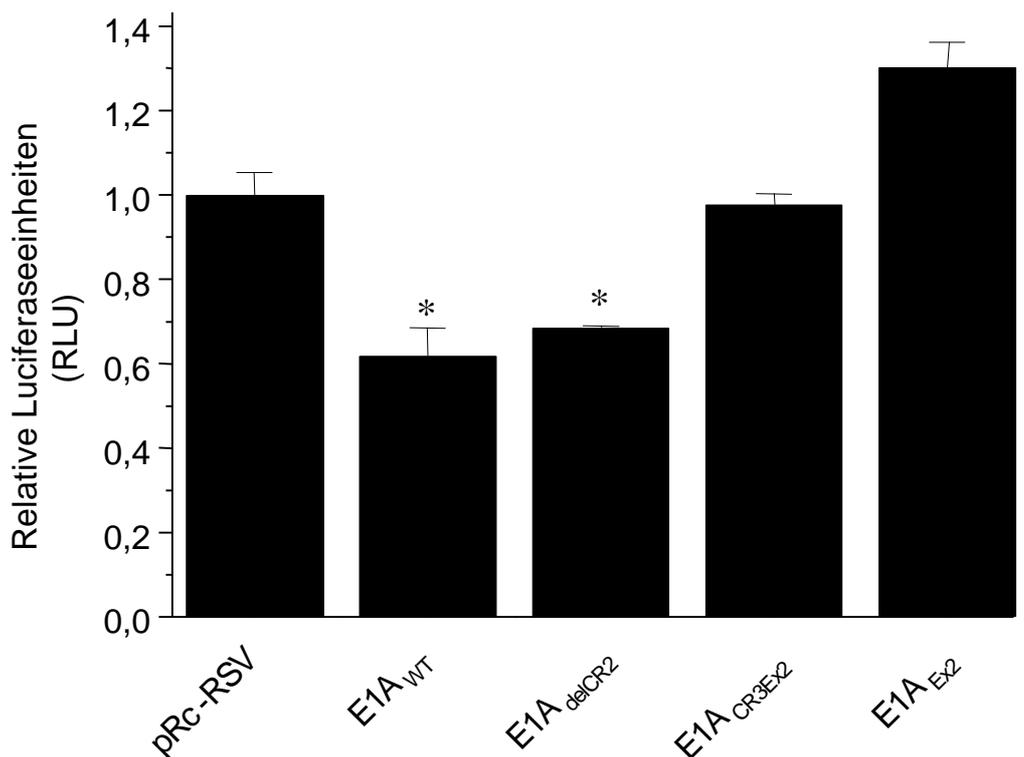


Abb. 31: Aktivierung des *hTERT*-Promotors durch die E1A-Konstrukte in H1299-Zellen. Die E1A-Konstrukte oder der pRc-RSV-Vektor wurden mit dem *hTERT*-Luciferase-Reporterkonstrukt in H1299-Zellen kotransfiziert und 48 h nach Beginn der Transfektion die Aktivität des Promotors gemessen. Die Auswertung wurde wie in Abb. 30 beschrieben vorgenommen. Der * zeigt signifikante Unterschiede im Vergleich zur pRc-RSV-Kontrolle bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ an.

Die E1A_{WT}- und E1A_{delCR2}-Proteine waren in der Lage, die Aktivität des *hTERT*-Promotors in den Zelllinien BLM und H1299 auf unterschiedliche Weise zu regulieren. Während sie in den BLM-Zellen den Promotor aktivieren konnten, wurde er in den H1299-Zellen durch die Konstrukte in seiner Aktivität wenig beeinflusst und lag dabei eher unter der Basalaktivität der Kontrolle. Diese Unterschiede in der Regulation des *hTERT*-Promotors können möglicherweise mit der Expression des endogenen hTERT-Proteins in Zusammenhang gebracht werden (s. Kap. 5.5).

5 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die hier konstruierten, transformationsdefekten E1A-Mutanten eine deutliche tumorsupprimierende Aktivität in zwei unterschiedlichen Tumormodellen aufwiesen. Sie können daher als antineoplastische Transgene für die Therapie maligner Erkrankungen in Betracht gezogen werden. Sie bieten gegenüber genomischen E1A-Konstrukten, die zur Zeit in ersten klinischen Studien eingesetzt werden (Hortobagyi *et al.*, 1998), den Vorteil, dass die Gefahren, die sich durch den Gentransfer eines transformierenden Onkogens ergeben, weitgehend eliminiert sind. Zudem wiesen die E1A-Mutanten im Vergleich zum E1A_{WT}-Konstrukt in vielen hier vorgenommenen Analysen eine verbesserte antitumorigene Wirkung auf.

E1A-Proteine haben die Fähigkeit, auch humane Zellen zu immortalisieren und in Kooperation mit einem zweiten viralen oder zellulären Onkogen vollständig zu transformieren (Graham *et al.*, 1977; Byrd *et al.* 1982). Derzeit wird kontrovers diskutiert, ob E1A-Proteine auch mit der Tumorentstehung beim Menschen in Zusammenhang gebracht werden können. Sanchez-Prieto *et al.* (1999) zeigten, dass die Expression von E1A-Proteinen zur chromosomalen Translokation und Bildung des onkogenen Fusionsproteins EWS/FLI1 führen kann, das z. B. für das Ewing's Sarkom charakteristisch ist. Es ist demzufolge die Gefahr einer Induktion oder Unterstützung des Tumorwachstums durch E1A-Proteine nicht auszuschließen. Um dieses Risiko in Hinblick auf eine Therapie maligner Erkrankungen mit E1A zu eliminieren, wurden E1A-Mutanten generiert, die ihr Transformationspotential in primären Nagerzellen verloren haben. Generell gilt die Dissoziation von E2F-Faktoren aus Pocketprotein/E2F-Komplexen und auch die Bindung von *de-novo*-synthetisiertem pRB durch E1A-Proteine als einer der initialisierenden Schritte bei der Immortalisierung (Egan *et al.*, 1989; Bernards, 1997; Moran 1994). Die freigesetzten E2F-Proteine regulieren als aktive Proteine durch die transkriptionelle Aktivierung der für die DNA-Replikation relevanten Gene den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus (Beijersbergen und Bernards, 1996). In den hier untersuchten E1A-Mutanten ist durch das Fehlen der CR2 und dem einhergehenden Verlust der Fähigkeit, die Pocketproteine zu binden, die Funktion der Zellzyklusaktivierung durch E1A-Proteine inaktiviert. Es konnte hier gezeigt werden, dass die E1A-Mutanten in Kooperation dem viralen Onkogen E1B primäre BMK-Zellen nicht mehr

transformierten (Kap. 4.3). Die Eliminierung des transformierenden Potentials der E1A-Konstrukte als eine essentielle Voraussetzung für die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war somit sichergestellt.

5.1 Suppression der Tumorigenität durch E1A-Proteine

Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, inwieweit die E1A-Konstrukte in der Lage sind, den tumorigenen Phänotyp der beiden hier untersuchten Tumormodelle, der hoch metastasierenden Melanomzelllinie BLM (van Muijen *et al.*, 1991) und der Bronchialkarzinomzelllinie H1299 (Takahashi *et al.*, 1992) zu revertieren. In Untersuchungen mit der Melanomzelllinie wurde im Nacktmausmodell gezeigt, dass die konstitutive Expression eines genomischen E1A-Konstruktes, das theoretisch alle E1A-Proteinprodukte exprimieren kann, eine antitumorigene Wirkung ausübte (van Groningen *et al.*, 1996). Daher war diese Zelllinie ein geeignetes Modellsystem für die Untersuchung der Tumorsuppressoraktivität der vom E1A_{WT}-Konstrukt abgeleiteten E1A-Mutanten. In den BLM-Zellen ist p53 durch eine Punktmutation inaktiviert (Guido Swart, Universität Nimwegen, Niederlande, persönliche Mitteilung) und HER-2/*neu* nicht überexprimiert (s. Kap. 4.4). Um in einem weiteren bezüglich dieser Eigenschaften vergleichbaren Tumormodellsystem die tumorsupprimierende Aktivität der E1A-Proteine zu untersuchen, bot sich die Verwendung der H1299-Zelllinie an, in der p53 homozygot deletiert ist und HER-2/*neu* ebenfalls nicht überexprimiert wird (Takahashi *et al.*, 1992 und Kap. 4.4). Mit der Verwendung einer Tumorzelllinie anderen Organursprunges konnte gleichzeitig ausgeschlossen werden, dass die Funktionen der E1A-Mutanten nur in einem Tumormodell ausgeübt werden können.

Die Ergebnisse bezüglich der Bildung G418-resistenter Kolonien bei der Expression der E1A-Konstrukte gaben bereits erste Hinweise auf eine mögliche Suppression des Wachstums der Tumorzelllinien durch einige E1A-Konstrukte. Die Transfektion sowohl des E1A_{WT}-Konstrukts als auch der Mutante E1A_{delCR2} reduzierte die Bildung von Kolonien im Vergleich zum pRc-RSV-Leervektor deutlich (Kap. 4.5). Dies ging mit der Problematik einher, stabile Zelllinien zu etablieren, die diese Konstrukte exprimierten (Kap. 4.6.1, 4.6.2). Ähnliche Beobachtungen wurden

mehrfach zumindest für das genomische E1A-Konstrukt in Versuchen mit verschiedenen Zelllinien beschrieben und könnten auf der bekannte apoptotischen Wirkung von E1A-Proteinen beruhen (Chen *et al.*, 1997; van Groningen *et al.*, 1996; Frisch, 1991). Im Fall der BLM-Zelllinie zeigten die Konstrukte E1A_{CR3Ex2} und E1A_{Ex2} keine Reduktion G418-resistenter Kolonien. Das für die E1A_{Ex2}-Mutante erzielte Ergebnis wird durch die Untersuchungen von Chen *et al.* (1997) bekräftigt, die ebenfalls zeigen konnten, dass die Transfektion eines E1A-Konstruktes, in dem die DNA-Sequenz für die Aminosäuren 40-186, d. h. für die konservierten Regionen deletiert ist, in einer HER-2/*neu*-überexprimierenden NIH3T3-Zelllinie zu keiner Reduktion der Kolonien führte. In der gleichen Zelllinie supprimierte eine Mutante, in der zusätzlich die CR1 erhalten war, allerdings die Koloniebildung (Chen *et al.*, 1997). Dabei ist jedoch davon auszugehen, dass in diesen Untersuchungen die E1A-Mutante die Bildung von G418-resistenten Kolonien hauptsächlich durch die Repression des *HER-2/neu*-Promotors verminderte. Da in der vorliegenden Arbeit jedoch in beiden Tumormodellen HER-2/*neu* nicht überexprimiert war, ist es fraglich, ob die Expression dieser Mutante hier zur Reduktion der Koloniebildung führen würde. Die Tatsache, dass im Gegensatz zur BLM-Zelllinie, in der H1299-Zelllinie auch die Mutanten E1A_{CR3Ex2} und E1A_{Ex2} in der Lage waren, das Wachstum G418-resistenter Kolonie zu inhibieren, spricht auch für zelltyp- bzw. gewebeabhängige Regulationsmechanismen. Es ist zusätzlich davon auszugehen, dass die Reduktion G418-resistenter Kolonien durch Expression der E1A-Konstrukte nicht durch eine p53-abhängige Induktion der Apoptose zustande kam (s. a. Kap. 5.2), da p53 in der H1299- und in der BLM-Zelllinie inaktiviert ist (Takahashi *et al.*, 1992; Guido Swart, persönliche Mitteilung).

Um erste Hinweise auf die Tumorigenität der E1A-exprimierenden Zelllinien zu erhalten, wurde im Vergleich zu den parentalen Zelllinien das Wachstum in halbfestem Medium untersucht. Die Fähigkeit von eukaryontischen Zellen, in Weichagar zu wachsen, gilt als ein häufig verwendetes Kriterium für das Ausmaß der Transformation (Macpherson und Montagnier, 1964). Zudem lassen sich oft aus diesen Untersuchungen Vorhersagen für die Tumorigenität dieser Zellen in immundefizienten Nagern treffen, da diese Eigenschaften bei vielen Tumorzelllinien positiv korrelieren (Freedman *et al.*, 1974). Es konnte gezeigt werden, dass die E1A-Mutanten E1A_{delCR2} und E1A_{CR3Ex2} die Fähigkeit der BLM- und H1299-Zellen kontaktunabhängig zu wachsen, signifikant reduzierten (Kap. 4.10). Die Ergebnisse

der Weichagaruntersuchungen konnten in den Tumorigenitätsstudien *in vivo* bestätigt werden (Kap. 4.11). Alle Zelllinien, in denen die Konstrukte E1A_{delCR2} und E1A_{CR3Ex2} stabil exprimiert wurden, zeigten eine deutliche Verzögerung der Tumorbildung.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass im Besonderen die CR3 für eine effektive Tumorsuppression in den hier untersuchten Zellsystemen von Bedeutung ist, da die Mutante E1A_{CR3Ex2} noch in der Lage war, die Tumorigenität der beiden Zelllinien zu unterdrücken, die Mutante E1A_{Ex2} aber nicht mehr. Bisher ist jedoch die Notwendigkeit eines Synergismus der beiden Regionen CR3 und Exon 2 nicht auszuschließen. Darüber sollen zukünftige Untersuchungen mit einer E1A-Mutante, die ausschließlich die CR3 exprimiert, Aufschluss geben.

Die stabile Expression von E1A-Proteinen kann in einer Reihe von Tumorzellsystemen die Tumorigenität effektiv unterdrücken (Frisch *et al.*, 1991; Sanchez-Prieto *et al.*, 1998; van Groningen *et al.*, 1996). In HER-2/*neu*-überexprimierenden Tumormodellen wurden zudem erfolgreiche Versuche mit der systemischen Gabe von E1A mittels Vektor- oder Liposomentransfer durchgeführt (Chang *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1995). Die antitumorigenen Eigenschaften von E1A-Proteinen in diesem System scheinen nach heutigem Wissensstand überwiegend durch die Suppression des *HER-2/neu*-Promotors bedingt zu sein (Chen und Hung, 1997). Die Analysen, die in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden bezogen sich jedoch auf HER-2/*neu*-unabhängige Tumormodelle. In Studien, in denen solche Tumormodelle in der Vergangenheit bezüglich ihrer Tumorigenität untersucht wurden, waren die Mechanismen die zur E1A-abhängigen Tumorsuppression führten, weniger aufgeklärt und scheinbar von einer Reihe von Faktoren abhängig (Frisch, 1991; van Groningen *et al.*, 1996).

So konnten van Groningen *et al.* (1996) zeigen, dass die Repression der Tumorigenität der BLM-Zellen durch ein genomisches E1A-Fragment von der Repression einer Reihe von Tumormarkern begleitet ist. In den in der vorliegenden Arbeit erfolgten Analysen war die Expression der Tumormarker PAI-1 und uPA zwar in den verschiedenen Zelllinien moduliert, ergab aber einen weniger eindeutigen Zusammenhang mit der Repression der Tumorigenität (Kap. 4.8). Die hier untersuchten E1A-Proteine bewirkten daher auch unabhängig von der Regulation dieser Tumormarker die Repression der Tumorigenität.

Frisch *et al.* (1995) konnten zeigen, dass die Expression des E1A-243R-Proteins die Tumorigenität verschiedener Tumorzelllinien durch die Induktion epithelialer Gene reduzieren kann. Dabei veränderte sich die Morphologie der Zellen zugunsten eines epithelialen Phänotyps (Frisch, 1997). Dagegen konnten in den hier untersuchten E1A-exprimierenden Zelllinien nicht die von Frisch beschriebenen morphologischen Veränderungen (Kap. 4.7) oder die Reorganisation des Zytoskeletts beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Es ist daher zu vermuten, dass andere, bisher nicht erkannte Mechanismen für die Repression der Tumorigenität durch die hier untersuchten E1A-Mutanten entscheidend sind. Dabei scheint die CR3 von besonderer Bedeutung zu sein. Die vielfach beschriebene Fähigkeit dieser E1A-Region, als Transaktivierungsdomäne zu fungieren (s. Kap. 1.3), deutet darauf hin, dass möglicherweise auch die Transaktivierung von unbekanntem oder bekannten Genen bei der Suppression der Tumorigenität von Wichtigkeit ist. Diese Region ist zumindest bei der Suppression der Transformation von entscheidender Bedeutung, da bei der Infektion von BRK- oder CREF-Zellen das E1A-289R-Protein die Frequenz der Transformation durch das E1A-243R-Protein reduzieren konnte (Haley *et al.*, 1984). Untersuchungen mit weiteren E1A-Mutanten könnten zukünftig Aufschluss über die Bedeutung der CR3 bei der Tumorsuppression geben.

Über die Repression der Tumorigenität durch mutierte E1A-Proteine ist generell bis heute wenig bekannt. In HER-2/*neu*-abhängigen Zellsystemen wurde durch die Expression von Mutanten, in denen die CR2 und CR3 deletiert sind, eine Reduktion der Tumorigenität erreicht (Chen *et al.*, 1997). Der bereits bekannte Mechanismus der Repression des *HER-2/neu*-Promotors durch die Interaktion des N-Terminus und CR1 von E1A mit p300 ist hier wahrscheinlich von entscheidender Bedeutung für die Reversion des malignen Phänotyps (Chen und Hung, 1997). In einem HER-2/*neu*-unabhängigen Zellsystem, einem epidermoiden Karzinom, war eine E1A-Mutante, in der Teile der CR2 deletiert sind und die somit nicht mehr an die Pocketproteine binden kann, ebenfalls nicht mehr zur Repression der Tumorigenität *in vivo* befähigt (Sanchez-Prieto *et al.*, 1998). Hier war die Beteiligung der CR3 daher nicht von Bedeutung. In diesem System war zudem sowohl der N-Terminus als auch die CR1 für eine antitumorogene Wirkung der E1A-Proteine (Sanchez-Prieto *et al.*, 1998) entbehrlich, was wiederum die hier vorgestellten Daten bestätigt.

Die Repression der Tumorigenität durch E1A ist offensichtlich von einer ganzen Reihe zelltypspezifischer Faktoren abhängig. Dies wird einerseits durch die Tatsache bekräftigt, dass in verschiedenen Tumormodellen unterschiedliche Regionen der E1A-Proteine für die Suppression notwendig sind (Sanchez-Prieto *et al.*, 1998; die vorliegende Arbeit). Zum anderen ist bisher nur für HER-2/*neu*-überexprimierende Tumoren ein eindeutiger Mechanismus aufgeklärt worden (Chen *et al.*, 1997). Studien an HER-2/*neu*-unabhängigen Tumormodellen beschäftigen sich zum jetzigen Zeitpunkt eher mit korrelativen Zusammenhängen zwischen der Suppression der Tumorigenität und Modulation zellulärer Faktoren (Frisch, 1991, Frisch *et al.*, 1994, 1995, van Groningen *et al.*, 1996, Sanchez-Prieto *et al.*, 1998).

Interessanterweise bildeten alle tumorsupprimierten Zelllinien mit Ausnahme der E1A_{delCR239} nach der Verlängerung der Latenzzeit Tumore aus. Die durchgeführten Tumoranalysen sprechen dafür, dass zumindest in einem großen Teil der im Tier inokulierten Zellen die Expression der E1A-Proteine entweder durch die Repression des RSV-Promotors oder durch posttranskriptionelle Mechanismen reprimiert wurde. Die Reversion zu einem malignen Phänotyp durch den Verlust der E1A-Expression in zuvor tumorsupprimierten Fibrosarkomzellen wurde auch von Frisch (1991) bereits beschrieben. Die Selektion gegen die Expression des Tumorsuppressorproteins p53 nach stabiler Integration in mit einem Onkogen transfizierte Rattenzellen wurde ebenfalls berichtet (Linzer und Levine, 1979). Außerdem ist bekannt, dass die Aktivität einiger Promotoren, wie z. B. des CMV-Promotors, nach dem Einbringen in immundefiziente Mäuse beeinträchtigt wird (Haak *et al.*, 1999).

Erstaunlicherweise zeigte das E1A_{WT}-Konstrukt mit Ausnahme der Zelllinie E1A_{WT}10 keinerlei antitumorigenen Eigenschaften. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Daten anderer Arbeitsgruppen, die zeigten, dass der Einsatz des E1A-289R-Proteins eine Reversion des tumorigenen Phänotyps bewirkte (Sanchez-Prieto *et al.*, 1998). Da sowohl die Expression der E1A-Proteine in den etablierten Zelllinien als auch die Sequenz der E1A-cDNA überprüft wurden, lässt sich ausschließen, dass die E1A-Proteine nicht funktionell waren. Zu vermuten ist, dass bei der Etablierung der Zelllinien, die das E1A_{WT}-Konstrukt exprimierten, solche Klone selektiert wurden, die die Funktion der E1A-Proteine tolerierten. Möglicherweise bildet die E1A_{WT}10-Zelllinie dabei eine Ausnahme und stellt somit ein Beispiel einer Zelllinie dar, in der das E1A_{WT}-Protein eine weitreichende antitumorigene Aktivität

besitzt. Derzeit sind jedoch eventuelle für die Tumorigenitätssuppression verantwortliche Insertionseffekte bei dieser Zelllinie nicht auszuschließen. Es war zwar einerseits möglich, Zelllinien auf die Toleranz der E1A-Expression zu selektieren. Dagegen wurde aber offensichtlich *in vivo*, wie die Analyse der E1A-Expression in den Tumoren belegte, die Expression von tumorsupprimierenden E1A-Proteinen überhaupt nicht toleriert. Dies spricht neben der Verlängerung der Latenzzeiten bei der Tumorbildung dafür, dass in den E1A-Proteinen einige wichtige antitumorigene Funktionen erhalten waren. Es liegt auf der Hand, dass solche Zelllinien, in denen E1A-Proteine ihre tumorsupprimierenden Eigenschaften in vollem Umfang ausüben, wahrscheinlich schwer zu etablieren sind. Es war dennoch für die Untersuchung einiger bearbeiteter Fragestellungen erforderlich, wie z. B. die der Tumorigenität *in vivo*, E1A-Proteine stabil zu exprimieren. Es gibt zahlreiche Erfahrungsberichte über die Problematik der Etablierung E1A-exprimierender Zelllinien (Guido Swart, Universität Nimwegen, Niederlande; Josephine Dorsman, Universität Leiden, Niederlande; Mien-Chie Hung, MD Anderson Cancer Center, Houston, USA, persönliche Mitteilungen), die bis heute wenig publiziert sind. Es besteht daher ein großes Interesse an der Nutzung eines E1A-induzierbaren Expressionssystems, um die Wirkungsweise gerade im Hinblick auf die Tumorsuppressoreigenschaften von E1A zu untersuchen. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde versucht, ein Ecdyson-induzierbares Expressionssystem (Invitrogen) zu etablieren. Die Problematik, dass für einen kurzen Zeitraum nach der Transfektion aufgrund der basalen Transkriptionsrate des Promotors auch ohne eine Induktion die Expression der transduzierten Konstrukte zu verzeichnen war, ist auch von anderen induzierbaren Expressionssystemen bekannt. Diese kurzzeitige Expression war offenbar für die Ausbildung eines Selektionsdrucks gegen die Zytotoxizität der exprimierten E1A-Proteine hinreichend. Bisher konnte in diesem System nur eine E1A_{WT}-induzierbare Zelllinie etabliert werden (Daten nicht gezeigt), in der aber eine typische E1A-Funktion nicht nachgewiesen werden konnte. Für zukünftige Untersuchungen der Tumorsuppressoraktivität von E1A wäre es jedoch von großem Vorteil, ein solches induzierbares System etablieren zu können.

5.2 Sensibilisierung gegenüber der Wirkung von Zytostatika durch E1A-Proteine

Eine bedeutsame Methode der Behandlung maligner Erkrankungen ist nach wie vor die Chemotherapie. Dabei wird trotz vielfältiger Wirkungsmechanismen verschiedener Zytostatika vornehmlich Apoptose induziert (Chu *et al.*, 1994; Fritsche *et al.*, 1993).

Abgesehen davon, dass die Therapie durch die systemische Verabreichung hoher Dosen zytotoxischer Substanzen grundsätzlich erhebliche Nebenwirkungen verursacht und unselektiv auch nicht maligne Zellen schädigt, bereitet die Resistenzbildung der Tumorzellen während der Therapieintervalle große Probleme.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die E1A-Mutanten E1A_{delCR2} und E1A_{CR3Ex2} in der Lage sind, zytostatikaresistente Zellen gegenüber der Behandlung mit Cisplatin und Doxorubicin zu sensibilisieren (Kap. 4.14.1 und 4.14.2). Dabei reichten bereits sehr geringe Dosen der DNA-schädigenden Substanzen aus, um die Anzahl der überlebenden Zellen nach der Behandlung deutlich zu reduzieren.

Die hier untersuchten Zytostatika üben ihre Wirkung vornehmlich über die Schädigung der DNA aus. Cisplatin bildet DNA-Addukte (Chu, 1994) und Doxorubicin ist ein DNA-interkalierendes Agens, das die Topoisomerase II bindet und DNA-, RNA- und Proteinsynthese inhibiert (Cummings *et al.*, 1991). In Tumorzellen mit Wildtyp-p53 führen diese DNA-Schädigungen unter anderem zur Akkumulation von nukleärem p53 (Fritsche *et al.*, 1993), das zelltypspezifisch entweder einen G1-Arrest für die DNA-Reparatur bewirkt oder die Apoptose induzieren kann (Nelson und Kastan, 1994; Kastan *et al.*, 1991). Der Erfolg der Therapie mit Zytostatika *in vivo* scheint daher auch abhängig vom p53-Status der Tumorzellen zu sein (Lowe *et al.*, 1994). Bei der Bildung von Resistenzen sind diese Mechanismen allerdings nicht mehr zu beobachten. Offenbar reagieren die Tumorzellen mit effektiven Abwehrmechanismen auf die durch Zytostatika induzierte Apoptose (Sethi *et al.*, 1999). Auf welche Weise die E1A-Proteine in diesem Fall in der Lage sind, eine Sensibilisierung gegenüber der Resistenzbildung bei der Zytostatikabehandlung zu bewirken, ist bisher nicht geklärt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass das Ausbleiben der p53-Stabilisierung durch die Zytostatika, durch E1A-Proteine

überwunden werden kann und somit Zellen für die Apoptose sensibilisiert (Deng *et al.*, 1998; Sanchez-Prieto *et al.*, 1995; Frisch *et al.*, 1995).

Ob die generierten E1A-Mutanten in p53-positiven Zellen prinzipiell in der Lage wären, eine p53-Stabilisierung zu bewirken, bleibt bisher ungeklärt. Einerseits konnte in HeLa-Zellen gezeigt werden, dass E1A-Proteine, die die p300-Bindungsfähigkeit verloren haben, die p53-Akkumulation nicht mehr vermitteln können. Bei dieser Funktion hat die pRB-Bindungsregion keine Bedeutung (Chiou und White, 1997). In einem humanen Lungenkarzinommodell war auch die Bindung von E1A an p300 für die p53-Akkumulation entbehrlich (Somasundaram und El-Deiry, 1997). In MEF-Zellen war für die E1A-bedingte p53-Akkumulation in Anwesenheit des Pocketproteins pRB die CR2 essentiell. Beim Fehlen von pRB konnte auch eine Mutante, in der die CR2 deletiert ist, die Akkumulation von p53 bewirken (Samuelson und Lowe, 1997). Wahrscheinlich ist allerdings, dass beim Fehlen der p300- und der pRB-Bindungsstelle, wie es bei den Mutanten E1A_{CR3EX2} und E1A_{EX2} der Fall ist, die E1A-vermittelte p53-Akkumulation nicht mehr möglich ist. Diese beiden Mutanten müssen daher die Aufhebung der Zytostatikaresistenz durch einen anderen Mechanismus vermitteln.

Da die hier untersuchten Zelllinien kein intaktes p53 exprimieren, kann die Aufhebung der Resistenzbildung ohnehin nicht durch die Stabilisierung von p53 und die darauffolgende Induktion p53-abhängiger Apoptose durch E1A-Proteine zustande kommen. Zudem konnte in keiner der Zelllinien nach der Behandlung mit Cisplatin oder Doxorubicin eine für die Apoptose typische DNA-Fragmentierung beobachtet werden (Kap. 4.14.2.). Sanchez-Prieto *et al.* (1995) zeigten, dass die E1A-vermittelte Sensibilisierung gegenüber DNA-schädigenden Substanzen auch auf einem p53-unabhängigen Weg beschritten werden kann. Der Einsatz von E1A-Mutanten verdeutlichte, dass in Mauskeratinozyten die Sensibilisierung gegenüber Cisplatin und Doxorubicin von der Bindung der Pocketproteine durch E1A-Proteine abhängig ist. Bei der Sensibilisierung gegenüber Cisplatin war zusätzlich die p300-Bindungsregion essentiell. Dies steht im Gegensatz zu den hier vorgestellten Untersuchungen, in denen mit Hilfe der Mutante E1A_{delCR2} die Entbehrlichkeit der Pocketproteinbindung für die Sensibilisierung demonstriert werden konnte. Wie die E1A_{CR3EX2}-Mutante zeigte, war auch die p300-Bindungsfähigkeit nicht von Bedeutung (Kap. 4.14.1 und 4.14.2). Jedoch ist hervorzuheben, dass im Gegensatz zu den E1A-Mutanten in den Untersuchungen von Sanchez-Prieto (1995), im Fall der in der hier

vorliegenden Arbeit eingesetzten sensibilisierenden Mutanten die CR3 enthielten. Es gibt Evidenzen, dass die CR3 an der Induktion p53-unabhängiger Apoptose beteiligt ist. Bei der Infektion mit einem Virus, das nur für das E1A-289R-Protein kodiert, wurde auch in p53-negativen Zellen Apoptose induziert (Teodoro *et al.*, 1995), während das E1A-243R-Protein nicht p53-unabhängig Apoptose induzieren konnte (Debbas und White, 1993; Lowe *et al.*, 1994). Das E1A-289R-Protein kann zudem die Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) -Spaltung aktivieren. PARP ist ein DNA-Reparaturenzym, das auf zellulären Stress reagiert (Wang *et al.*, 1995). Es trägt mit seiner Funktion zur Genom-Integrität bei (Bürkle *et al.*, 1992). In der frühen Phase der Apoptose wird PARP durch seine Spaltung durch aktive Mitglieder der Ced-3 Proteasen, wie z. B. CPP32, inaktiviert (Kaufmann *et al.*, 1993; Lazebnik *et al.*, 1993, Nicholson *et al.* 1995). CED-3 Proteasen gelten daher auch als wichtige Regulatoren der Apoptose (Kumar, 1995; Earnshaw, 1995). Die Prozessierung der CPP32 in seine aktive Form kann durch die Expression des E1A-289R-Proteins induziert werden (Boulakia *et al.*, 1996). Diese Funktion des E1A-289R-Proteins, die wahrscheinlich auf die Transaktivierungsdomäne CR3 zurückzuführen ist, spielt möglicherweise auch eine Rolle bei der Sensibilisierung gegenüber Zytostatika durch die Mutanten E1A_{delCR2} und E1A_{CR3Ex2}.

In den hier vorgenommenen Analysen war zu beobachten, dass trotz der Sensibilisierung auch die maximal eingesetzten Zytostatikakonzentrationen nicht zum Zelltod aller Zellen führte. Es überlebten immer mindestens 10% der Zellen die Behandlung. Dies führt zu dem Schluss, dass möglicherweise nur Zellen, die sich in einer bestimmten Phase des Zellzyklus befinden, sensibilisiert sind. Da die hier eingesetzten Zytostatika vornehmlich in der S-Phase des Zellzyklus wirksam sind (Cummings *et al.*, 1991; Chu, 1994), ist es denkbar, dass die E1A-Proteine solche Zellen, die sich in einer anderen Zellzyklusphase befinden, nicht sensibilisieren. Dies bedeutet weiterhin, dass die Fähigkeit der E1A-Proteine zur Aufhebung der Zytostatikaresistenz von zellzyklusregulierten Faktoren abhängig sein könnte. Eine Verlängerung der Behandlungsdauer soll zukünftig darüber Aufschluss geben.

Interessanterweise waren die E1A_{WT}-exprimierenden Zelllinien bei höheren Doxorubicinkonzentrationen größtenteils sensibilisiert. Wie auch Untersuchungen von Sanchez-Prieto (1998) verdeutlichen, scheint die durch E1A-Proteine vermittelte Sensibilisierung je nach Art der durch Zytostatika verursachten DNA-Schädigung auf unterschiedliche Mechanismen zurückzuführen sein. Die für die Sensibilisierung von

Doxorubicin verantwortliche Funktion der E1A-Proteine, ist offenbar in den E1A_{WT}-Zelllinien trotz der diskutierten Selektionsmechanismen intakt (s. Kap. 5.1).

Wie für die Suppression der Tumorigenität kann auch hier festgestellt werden, dass für die Sensibilisierung gegenüber den eingesetzten DNA-schädigenden Substanzen, die Mutante E1A_{CR3EX2} hinreichend wirksam ist. Es wäre daher denkbar, diese E1A-Mutante zukünftig unterstützend bei der Chemotherapie maligner Erkrankungen einzusetzen.

5.3 Einfluss der E1A-Proteine auf das Metastasierungspotential

Da die Bildung von Metastasen ein Problem in der konventionellen Tumorthherapie darstellt, ist eine wesentliche Erweiterung systemisch wirksamer Agenzien notwendig, die die Metastasierung vermeiden. Die Kaskade der Metastasierung umfasst eine Reihe von Interaktionen zwischen Tumorzellen und ihrer Umgebung. Dabei sind nach dem heutigen Kenntnisstand vor allen Dingen Zelladhäsionsmoleküle, ECM-degradierende Proteasen und Peptide, die an der Neovaskularisierung beteiligt sind, für das Metastasierungspotential von Tumoren von Bedeutung (Übersicht bei Ahmad und Hart, 1997). Aktuelle Untersuchungen verdeutlichen den Einfluss von E1A-Proteinen auf die Expression von Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Adhäsionsproteinen und Matrix-degradierenden Proteasen *in vitro* (Übersicht bei Mymryk, 1996). Zudem wurde gezeigt, dass der Gentransfer von E1A in HER-2/*neu*-überexprimierende Tumoren das Metastasierungspotential *in vivo* reduziert (Yu *et al.*, 1995). Auch in HER-2/*neu*-unabhängigen Zellsystemen ging die Expression von E1A-Proteinen mit der Reduktion des Metastasierungspotentials einher (Pozzatti *et al.*, 1988).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen zum Metastasierungspotential der BLM-Zellen zeigten, dass bezüglich der Reduktion der Invasivität lediglich eine Korrelation mit der Expression des E1A_{CR3EX2}-Konstruktes bestand. Unter anderem spielt das Zell-Zell-Adhäsionsmolekül E-Cadherin bei der Invasion von Zellen im Zuge der Metastasierung eine wichtige Rolle. Die Expression von E-Cadherin führte zur Reduktion der Invasionsfähigkeit verschiedener Zelllinien (Chen *et al.*, 1997). In Arbeiten von Frisch *et al.* (1994) konnte in einer von fünf

untersuchten Zelllinien eine Aktivierung der E-Cadherin Expression durch das E1A-243R-Protein gezeigt werden. Gleichzeitig scheint das Exon 2 der E1A-Proteine, bzw. die für die Interaktion mit CtBP relevante Domäne (Schaeper *et al.*, 1995) für die korrekte Lokalisierung von E-Cadherin in der Zelle verantwortlich zu sein (Gopalakrishnan und Quinlan, 1995). Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass E1A-Proteine die Invasion supprimieren können. Allerdings konnte in den hier untersuchten E1A-exprimierenden Zelllinien keine Veränderung bezüglich der E-Cadherin-Expression beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise spielt das E1A-289R-Protein nur eine untergeordnete Rolle bei der Suppression der Invasivität. Daten von Pozzatti *et al.* (1988) belegen zumindest, dass E1A-243R-Protein in Kooperation mit Ha-Ras transformierte Zelllinien weniger aggressiv metastasieren als solche, die mit dem E1A-289R-Protein in Kooperation mit Ha-Ras transformiert wurden. Die bereits diskutierte Selektion gegen E1A-Funktionen bei der Etablierung E1A-exprimierender Zelllinien ist jedoch auch hier nicht auszuschließen (s. Kap. 5.1).

Der Einfluss von E1A-Proteinen auf die Aktivität der MMP-2 wurde bisher anhand von Promotorstudien untersucht (Somasundaram *et al.*, 1996). Die Repression von MMP-2 geschieht über den zelltypspezifischen Transkriptionsfaktor AP-2, dessen Dimerisierungsdomäne mit E1A-Proteinen interagiert. Die dafür benötigte E1A-Region befindet sich zwischen den Aminosäureresten 2-36. Die Interaktion zwischen E1A und AP-2 führt dabei, unabhängig von der Bindung an p300, zur Repression des *MMP-2*-Promotors (Somasundaram *et al.*, 1996). Die Unabhängigkeit von der Bindung an p300 geht einher mit den hier vorgestellten Ergebnissen (Kap. 4.17.2), dass auch die Mutante E1A_{CR3EX2} eine Repression der MMP-2 Aktivität vermitteln kann. Da die Aminosäuren 2-36 hier offensichtlich für die Repression nicht essentiell sind, ist es denkbar, dass daneben andere E1A-Funktionen eine Rolle spielen. Da in den Studien von Somasundaram *et al.* (1996) die Funktion des E1A-289R-Protein nicht analysiert wurde, bleibt offen, ob die CR3 möglicherweise über andere Mechanismen die Repression der MMP-2-Transkription vermitteln kann. Für eine verwandte MMP, die MMP-9, konnte die Bedeutung der CR3 für die Repression der MMP-9 Aktivität demonstriert werden (Bernhard *et al.*, 1995). Da es aber keine Beispiele für eine mögliche Transrepression durch die CR3 gibt, ist zu vermuten, dass die Repression der MMP-9 und möglicherweise auch der MMP-2 aus der E1A-vermittelten Transaktivierung eines Inhibitors der MMP-

Expression resultiert. Die TIMPs sind bereits bekannte Inhibitoren der MMPs. Zudem können E1A-Proteine die Expression der TIMPs induzieren (Santoro *et al.*, 1994). Möglicherweise reprimieren die E1A-Mutanten die MMP-2-Aktivität somit über die transkriptionelle Aktivierung der TIMPs.

In den hier vorgenommenen Untersuchungen war die Expression des Metastasierungssuppressors KAI1 besonders durch das E1A_{WT}- und das E1A_{delCR2}-Protein aktivierbar (Kap. 4.15.3). Diese metastasierungssupprimierende Fähigkeit der E1A-Proteine war bisher nicht beschrieben. Auch ist die Funktion des Transmembranproteins unbekannt. Jedoch inhibiert die transiente Expression von KAI1 die Metastasierung von Kolonkarzinomzellen (Takaoka *et al.*, 1998). Zusätzlich korreliert die Expression von KAI1 strikt mit der reduzierten Fähigkeit zur Metastasierung (Sun *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1997).

Der *KAI1*-Promotor besitzt eine p53-Konsensusbindungsregion und ist zudem direkt durch p53 aktivierbar (Mashimo *et al.*, 1998). Da in der H1299-Zelllinie p53 homozygot deletiert ist, kann die Aktivierung von p53 durch E1A-Proteine in diesem System keine Rolle spielen. Da sich im *KAI1*-Promotor zahlreiche *SP1*-Bindestellen befinden (Dong *et al.*, 1997), wäre es denkbar, dass die E1A-vermittelte Expression von KAI1 darüber zustande kommen kann (s. a. Kap. 5.5). Indirekte E1A-vermittelte Mechanismen könnten ebenfalls für die Induktion der KAI1-Expression verantwortlich sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die E1A-Konstrukte einen Einfluss auf die metastasierungsrelevanten Faktoren KAI1 und MMP-2 haben und somit in der Lage sind, das Metastasierungspotential von Tumorzellen zu supprimieren. Diese Funktion wäre für den Einsatz von E1A in der Therapie von Tumoren von großer Bedeutung, da die Metastasenbildung eines der größten Probleme der konventionellen Tumorthherapie darstellt.

5.4 Einfluss der E1A-Proteine auf die Aktivität des humanen *p53*-Promotors

Es wurde bereits diskutiert, dass die E1A-Mutanten möglicherweise nicht mehr in der Lage sind, die durch die *p53*-Stabilisierung induzierte Apoptose zu vermitteln (s. Kap. 5.2). Da es bei der Behandlung von Tumoren mit aktivem *p53* von Vorteil wäre, die *p53*-Funktion hinsichtlich der Apoptoseinduktion zu nutzen, stellte sich die Frage, ob die E1A-Mutanten *p53* über einen anderen Mechanismus aktivieren können. Da das E1A-289R-Protein mit der CR3 eine starke Transaktivierungsfunktion besitzt, lag es nahe zu untersuchen, ob die E1A-Mutanten, in der die CR3 erhalten ist, auch die Transkription von *p53* aktivieren können.

Für diese Untersuchungen wurde mit A549-Zellen ein für diesen Zweck bereits etabliertes Zellsystem verwendet, in dem transiente Promotorstudien durchgeführt wurden. Dabei konnte das E1A_{WT}- oder das E1A_{delCR2}-Konstrukt den humanen *p53*-Promotor aktivieren. Weder die E1A_{CR3Ex2}-noch die E1A_{Ex2}-Mutante war zur Aktivierung des Promotors befähigt (s. Kap. 4.16). Erste weitergehende Untersuchungen zeigen eine Aktivierung des *p53*-Promotors durch das E1A_{WT}- und E1A_{delCR2}-Protein auch in H1299- und BLM-Zellen (Daten nicht gezeigt).

Für den murinen *p53*-Promotor konnte demonstriert werden, dass die beiden E1A-289R- und E1A-243R-Proteine zusammen zur Transaktivierung befähigt sind (Hale und Braithwaite, 1999). Allerdings sind der murine und der humane *p53*-Promotor nicht homolog. Der humane *p53*-Promotor besitzt als mögliche durch E1A-Proteine aktivierbare Elemente eine NF- κ B-Bindestelle und ein AP-1-Element. Diese beiden Elemente sind essentiell für die Aktivierung des Promotors und wirken synergistisch zusammen mit einer Myc/Max-Bindestelle (Kirch *et al.*, 1999). Für die Transkription vom *p53*-Promotor ist die Bindung von c-Jun und c-Fos an das AP-1-Element essentiell. Die Untersuchungen anderer Promotoren weisen darauf hin, dass E1A-Proteine die Transkription stimulieren, indem sie durch eine Interaktion die Konformation von c-Jun verändern. Daraufhin wird die Transaktivierungsdomäne von c-Jun phosphoryliert und damit aktiviert (Sano *et al.*, 1998). Da für diese Funktion neben der CR3 der N-Terminus und die CR1 notwendig sind, ist von einer Beteiligung der p300-Bindungsfunktion auszugehen (Dyndam *et al.*, 1999). Dies

würde außerdem die fehlende Aktivierungsfunktion der Mutanten E1A_{CR3Ex2} und E1A_{Ex2} erklären.

Das E1A-289R-Protein aktiviert im Gegensatz zum E1A-243R-Protein die NF- κ B-abhängige Transkription. Das E1A-289R-Protein bindet über die CR3 an die p65-Untereinheit (Rel A) von NF- κ B (Paal *et al.*, 1997). Gleichzeitig ist für die Aktivierung die Phosphorylierung dieser Untereinheit durch PKA essentiell (Zhong *et al.*, 1998). Durch die Rekrutierung von PKA an den Promotor könnte E1A die Phosphorylierung von p65 vermitteln. Es wäre ebenso denkbar, dass das Transaktivierungspotential von der Assoziation von TBP mit der CR3 des E1A-289R-Proteins abhängig ist, wie es für die HIV1-Genexpression gezeigt werden konnte (Parker *et al.*, 1997). Dabei ist im Gegensatz zur Aktivierung NF- κ B-abhängiger Genexpression in Abwesenheit von E1A-Proteinen p300 bei der kooperativen Stimulation der Genexpression durch E1A und p65 nicht essentiell (Parker *et al.*, 1997). Dieser Mechanismus der CR3-abhängigen Aktivierungsfunktion könnte für das Aktivierungspotential der E1A_{WT}- und E1A_{delCR2}-Konstrukte verantwortlich sein. Zum Teil konnte bei ersten Untersuchungen in der H1299-Zelllinie eine leichte Aktivierungsfunktion durch die Mutante E1A_{CR3Ex2} beobachtet werden, was möglicherweise auch auf die Beteiligung der CR3 an der NF- κ B-vermittelten Promotoraktivierung zurückzuführen ist.

Zudem könnte die Rekrutierung von hSur-2 als Bestandteil eines Transkriptionsmediatorkomplexes an den Promotor durch die CR3 für eine erhöhte Transkription von Bedeutung sein. Die Interaktion scheint für die über E1A-vermittelte Aktivierung der Transkription durch die RNA-Polymerase II essentiell zu sein (Boyer *et al.*, 1999; s. a. Kap. 1.3 und 5.5).

Die Fähigkeit der E1A_{delCR2}-Mutante, den humanen p53-Promotor zu aktivieren, ist hinsichtlich des Einsatzes transformationsdefekter E1A-Mutanten bei der Therapie von Tumoren mit intaktem p53 sehr interessant. Es wäre denkbar, dass eine zusätzliche transkriptionelle Aktivierung von p53 die Induktion der Apoptose herbeiführen oder verstärken kann. Zudem könnte man zukünftig den RSV-Promotor durch den p53-Promotor beim Gentransfer von E1A-Mutanten ersetzen. Erste eigene Untersuchungen deuten nämlich auf eine starke Aktivität des p53-Promotors besonders in solchen Zellen hin, in denen p53 nicht exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Somit würde sich die Möglichkeit bieten, den p53-Promotor für die

tumorspezifische Expression von E1A-Mutanten in p53-negativen Tumoren zu verwenden.

5.5 Einfluss der E1A-Proteine auf die Aktivität des *hTERT*-Promotors

In den letzten Jahren wurde man zunehmend auf die Bedeutung der Telomerase bei der Onkogenese aufmerksam. Die Telomerase ist ein Enzym, das Nukleotide an die Telomere addiert und somit karyotypische Stabilität verschafft (Harley *et al.*, 1990). Sie gleicht dabei den Verlust von DNA bei der Replikation aus. In Abwesenheit der Telomeraseaktivität, wie es in normalen Zellen der Fall ist, führt die Verkürzung der Telomere nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen zum Einsetzen der Seneszenz (Harley *et al.*, 1990). In 85% aller Tumoren und in den meisten etablierten Zelllinien ist jedoch die Telomerase hoch exprimiert (Kim *et al.*, 1994). Diese Tatsache führte zu der Schlussfolgerung, dass die Aktivierung der Telomerase, die auf der Ebene der katalytischen Untereinheit hTERT reguliert wird, einen Mechanismus darstellt, durch den Zellen der normalen Kontrolle im Alterungsprozess entkommen können (Meyerson *et al.*, 1997). Zudem wurde kürzlich gezeigt, dass humane Zellen *in vitro* durch die Kooperation des Large-T-Antigens des SV40-Virus und des Ha-Ras-Proteins mit der Telomerase transformiert werden können (Hahn *et al.*, 1999).

Aufgrund der wahrscheinlichen Beteiligung der Telomerase an der Entstehung von Tumoren, könnte es von Bedeutung für die Tumorthherapie sein, einen geeigneten Inhibitor einzusetzen. Da die Aktivität des TERT-Proteins vermutlich auf transkriptioneller Ebene reguliert wird (Nakayama *et al.*, 1998), wurde der Einfluss der E1A-Konstrukte auf die transkriptionelle Regulation des *hTERT*-Promotors untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die E1A-Konstrukte E1A_{WT} und E1A_{delCR2} den *hTERT*-Promotor zelltypabhängig aktivieren oder reprimieren konnten, während die Mutanten E1A_{CR3EX2} und E1A_{EX2} keinen Einfluss auf die Promotoraktivität hatten (s. Kap. 4.17). Der *hTERT*-Promotor konnte erst kürzlich kloniert werden (Horikawa *et al.*, 1999). Eine im Promotorbereich befindliche

E-Box ist für seine Aktivierbarkeit entscheidend. Darüber hinaus befinden sich mehrere SP1-Bindestellen im Promotor. Die Interaktion der CR3 unter Beteiligung der AR1 der E1A-Proteine mit SP1-Transkriptionsfaktoren kann zur Aktivierung der Transkription verschiedener zellulärer Gene führen, wie z. B. des *hsp70*-Gens (Ström *et al.*, 1998). Zudem ist die Interaktion der CR3 mit hSur-2 für die E1A-vermittelte Stimulation der Transkription durch die RNA-Polymerase II wohl von entscheidender Bedeutung (Boyer *et al.*, 1999; s. a. Kap. 1.3 und 5.4). Dies spricht zunächst für die in den BLM-Zellen beobachtete Aktivierung des *hTERT*-Promotors durch die E1A-Konstrukte, in der die CR3 erhalten ist. In den hier vorliegenden Ergebnissen konnte aber die E1A_{CR3Ex2}-Mutante den Promotor nicht mehr aktivieren. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Aktivierungsfunktion der CR3 weitere Interaktionspartner benötigt. Dafür in Frage kommen z. B. die zellulären Kofaktoren p300/CBP, deren Rekrutierung an den Promotor durch den N-Terminus und die CR1 der E1A-Proteine denkbar wäre. Im Falle der H1299-Zellen hingegen wirkten die Konstrukte E1A_{WT} und E1A_{delCR2} repressorisch auf den *hTERT*-Promotor. Interessanterweise ist in normalen Zellen, in denen kaum endogene hTERT-Aktivität vorhanden ist, ein transient transfiziertes *hTERT*-Promotorkonstrukt ebenfalls kaum aktiv. Dagegen hat das gleiche Promotorkonstrukt in Zellen, in denen eine hohe endogene hTERT-Aktivität zu messen ist, eine sehr hohe Aktivität (Horikawa *et al.*, 1999). Möglicherweise beruhen die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Unterschiede der Modulation des *hTERT*-Promotors durch die E1A-Konstrukte in den untersuchten Zelllinien auf einer unterschiedlichen Expression endogener hTERT-Proteine, was noch zu zeigen ist. Es wäre denkbar, dass die Repressorfunktion des E1A_{WT}- und E1A_{delCR2}-Konstruktes im Kontext der H1299-Zellen durch die vielfach beschriebene Interaktion mit p300/CBP zustande kommt (s. Kap. 1.4). Bisher sind keine Daten bekannt, die Aufschluss über den Einfluss von E1A-Proteinen auf die Regulation des *hTERT*-Promotors geben könnten. Allerdings weisen die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Promotorstudien darauf hin, dass die E1A-Proteine als mögliche Telomeraseinhibitoren in bestimmten Tumoren in Frage kommen. Die Repression der Telomeraseaktivität könnte beim Einsatz von E1A-Mutanten als antineoplastische Transgene von Bedeutung sein. Zudem wäre es denkbar, sich den *hTERT*-Promotor für die Expression der E1A-Mutanten beim Gentransfer zu Nutze zu machen. Da die Aktivität des *hTERT*-Promotors in Zellen mit einer endogenen TERT-Expression, die in normalen Zellen nicht vorkommt, besonders stark ist (Horikawa *et al.*, 1999),

könnten die E1A-Mutanten gewebespezifisch exprimiert werden. Aufgrund der hohen Inzidenz hTERT-exprimierender Tumoren (Kim *et al.*, 1994) wäre eine effektive E1A-Expression in einer Vielzahl von Tumoren erreichbar.

5.6 Ausblick

Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass Transformationsdefekte minimale E1A-Mutanten die Tumorigenität zweier unterschiedlicher Tumorzelllinien effektiv supprimierten. Diese Mutanten modulierten metastasierungsrelevante Faktoren. Zudem konnten sie die Zytostatikaresistenz der Zellen aufheben. Dabei zeigte sich, dass die stabile Expression der Mutanten E1A_{delCR2} und E1A_{CR3Ex2} in beiden Tumorzelllinien eine weitaus effektivere tumorsupprimierende Wirkung ausübte als die Expression des E1A_{WT}-Konstrukts. Für die Tumorsuppressorfunktionen, die mit Hilfe stabil exprimierender E1A-Zelllinien analysiert wurden, war die E1A_{CR3Ex2}-Mutante, die nur die CR3 und das Exon 2 umfasst, hinreichend.

In weiteren Untersuchungen soll festgestellt werden, ob eine Mutante, die ausschließlich die CR3 exprimiert, diese tumorsupprimierenden Funktionen beibehält. Dabei sollen vor allen Dingen Tumorigenitätsstudien Aufschluss geben. Zudem soll der Einfluss der E1A-Mutanten auf weitere metastasierungsrelevante Faktoren untersucht werden, um diese für die Tumorthapie äußerst interessante Funktion weiter aufklären zu können. Für die Funktionsanalysen wäre es dabei von Vorteil, die E1A-Mutanten induzierbar exprimieren zu können.

Um die hier untersuchten Mutanten in ersten klinischen Studien anwenden zu können, müssen weiterhin Therapieansätze im Nagermodell unternommen werden. Damit wurde bereits mit der Mutante E1A_{delCR2} begonnen, und erste Ergebnisse zeigen, dass die intratumorale Injektion dieses Konstruktes zur Verzögerung der Tumorbildung führt. Es müssen im Hinblick darauf aber noch effektivere Gentransfermethoden etabliert werden. Zusätzlich wäre der Einsatz von tumor- oder gewebespezifischen Promotoren für die Expression der E1A-Mutanten von Vorteil.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Neben der Verwendung von E1A-Proteinen bei der Aufklärung zellulärer Prozesse wurde in den letzten Jahren zunehmende Aufmerksamkeit auf die Tumorsuppressoraktivität von E1A gelenkt. E1A-Proteine sind in der Lage, die Tumorigenität und Metastasierung in Tumorzellen deutlich zu reduzieren. Dies ist gerade im Hinblick auf die unzulänglichen Heilungsmethoden vieler maligner Erkrankungen interessant, die es dringend notwendig machen, neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln. Nach heutigen Erkenntnissen kommt E1A für die Behandlung von Tumoren als antineoplastisches Transgen in Frage. Eine Problematik für den Einsatz als therapeutisches Agens ergibt sich jedoch aus der Fähigkeit von E1A-Proteinen, primäre Zellen in Kooperation mit einem weiteren Onkogen zu transformieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Tumorsuppressoreigenschaften auch in solchen E1A-Mutanten erhalten sind, die nicht mehr transformieren können. Dazu wurden in zwei verschiedenen Tumormodellen, der hoch metastasierenden Melanomzelllinie, BLM, und der Bronchialkarzinomzelllinie, H1299, solche E1A-Mutanten stabil exprimiert, deren Transformationsdefizienz zuvor in BMK-Zellen bestätigt wurde. Die Konstrukte E1A_{delCR2} und E1A_{CR3Ex2} zeigten einen deutlichen tumorsupprimierenden Einfluss auf die Tumorzelllinien. Dies konnte zum einen durch die verminderte Fähigkeit der diese Mutanten exprimierenden Zelllinien, unabhängig von einer festen Verankerungsfläche in halbfesten Medium zu wachsen, nachgewiesen werden. Zum anderen bildeten diese E1A-Mutanten exprimierenden Zelllinien im Vergleich zu den jeweiligen parental Zellen erst nach einer signifikanten Verzögerung Tumore in immundefizienten Mäusen aus. Ein H1299-Derivat, das ein E1A_{delCR2} Konstrukt exprimierte, konnte keine Tumoren mehr entwickeln. Die Repression der Tumorigenität ist dabei unabhängig von der Repression des *HER-2/neu*-Promotors und ebenfalls unabhängig von der Induktion epithelialer Gene. Bei der Untersuchung der Metastasierungsfähigkeit der E1A-exprimierenden Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die beiden zuvor beschriebenen tumorsupprimierenden Mutanten, die Aktivität einer metastasierungsrelevanten Protease, der MMP-2, reprimierten. Dabei induzieren die E1A-Mutanten möglicherweise die Expression der TIMPs, die ihrerseits die Aktivität

der MMPs reprimieren. Die Behandlung der etablierten Zelllinien mit in der Therapie von Tumoren eingesetzten Zytostatika verdeutlichte, dass die Expression der beiden Mutanten die Zytostatikaresistenz der Zelllinien aufheben konnten. Es gelang somit auch beim Einsatz geringer Mengen der DNA-schädigenden Substanzen, die Zelllinien für die Wirkung zu sensibilisieren. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression der CR3 zusammen mit dem Exon 2 der E1A-Proteine ausreicht, um eine effektive Tumorsuppression zu erzielen. Die Mutanten, in denen diese beiden Regionen erhalten war, hatten eine über die des E1A_{WT}-Proteins hinausgehende tumorsupprimierende Aktivität.

Anhand transienter Transfektionsstudien konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die E1A-Mutante E1A_{delCR2} den *p53*-Promotor aktivieren und daher zur Induktion der Apoptose beitragen kann. Diese Funktion beruht vermutlich auf der transaktivierenden Wirkung der CR3. Es scheinen jedoch aufgrund der Unentbehrlichkeit des N-Terminus und der CR1 weitere, noch nicht identifizierte Faktoren notwendig zu sein. Die Mutante E1A_{delCR2} war ebenfalls abhängig vom Zelltyp in der Lage, den Promotor der katalytischen Untereinheit der Telomerase, die bei der Entstehung von Tumoren wahrscheinlich von großer Bedeutung ist, zu supprimieren. Vermutlich wird die Repression durch die Bindung der E1A-Mutante an die zellulären Kofaktoren p300/CBP vermittelt.

In der vorliegenden Arbeit konnte unter Beweis gestellt werden, dass mutierte E1A-Proteine auch unabhängig von ihrem Transformationspotential weitreichende tumorsupprimierende Funktionen ausüben können. Die hier vorgestellten tumorsupprimierenden E1A-Mutanten sind daher für den Einsatz als therapeutische Transgene in der Tumorthherapie hervorragend geeignet.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Ahmad A. und Hart I.R. (1997): Mechanisms of metastasis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **26**: 163-173.

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E. et al., eds. (1997): Current protocols in molecular biology. New York: Wiley

Bannister A.J. und Kouzarides T. (1995): CBP-induced stimulation of c-Fos activity is abrogated by E1A. *EMBO Journal* **14**: 4758-4762.

Bayley S.T. und Mymryk J.S. (1994): Adenovirus E1A proteins and transformation (review). *Int. J. Oncology* **5**: 425-444.

Beijersbergen R.L. und Bernards R. (1996): Cell cycle regulation by the retinoblastoma family of growth inhibitory proteins. *Biochem. Biophys. Acta* **1287**: 103-120.

Bernards R. (1997): E2F: a nodal point in cell cycle regulation. *Biochem. Biophys. Acta* **1333**: 33-44.

Bernhard E.J., Hagner B., Wong C., Lubenski I. und Muschel R.J. (1995): The effect of E1A on MMP-9 expression and metastatic potential. *Int. J. Cancer* **60**: 718-724.

Bernstine E.G., Hooper M.L., Grandchamp S. und Ephrussi B. (1973): Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 3899-3903.

Birnboim, H.C. und Doly J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523.

Boulakia C.A., Chen G., Ng R.W.H., Teodoro J.G. Branton P.E., Nicholson D.W., Poirier G.G. und Shore G.C. (1996): Bcl-2 and adenovirus E1B 19kDa protein prevent E1A-induced processing of CPP32 and cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase. *Oncogene* **12**: 529-535.

Boyd J.M., Subramanian T., Schaeper U., La Regina M., Bayley S. und Chinnadurai G. (1993): A region in the C-terminus of adenovirus 2/5 E1a protein is

required for association with a cellular phosphoprotein and important for the negative modulation of T24-ras mediated transformation, tumorigenesis and metastasis. *EMBO J.* **12**: 469-478.

Boyer T.G., Martin M.E.D., Lees E., Ricciardi R.P. und Berk A.J. (1999): Mammalian Srb/mediator complex is targeted by adenovirus E1A protein. *Nature* **399**: 276-279.

Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.

Braithwaite A., Nelson C., Skulimowski A., McGovern J., Pigott D. und Jenkins J. (1990): Transactivation of the p53 oncogene by E1a gene products. *Virology* **177**: 595-602.

Branton P.E., Bayley S.T. und Graham F.L. (1985): Transformation by human adenoviruses. *Biochim Biophys Acta* **780**: 67-94.

Brockmann D. und Esche H. (1995): Regulation of viral and cellular gene expression by E1A proteins encoded by the oncogenic adenovirus type 12. In: The molecular repertoire of adenoviruses Vol. III (Editors: Doerfler W. und Böhm P), *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199**, 81-112.

Bühl A. und Zöfel P. (1994): SPSS für Windows Version 6: Praxisorientierte Einführung in die moderne Datenanalyse. *Addison-Wesley Publishing Company*.

Bürkle A., Grube K und Küpper J.H. (1992): Poly(ADP-ribosyl)ation: its role in inducible DNA amplification, and its correlation with the longevity of mammalian species. *Exp. Clin. Immunogenet.* **9**: 230-240.

Byrd P., Brown K.W. und Gallimore P.H. (1982): Malignant transformation of human embryo retinoblasts by cloned adenovirus 12 DNA. *Nature* **298**: 69-71.

Cailleau R., Olive M. und Cruciger Q.V. (1978): Long term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* **14**: 911-915.

Chakravarti D., Ogryzko V., Kao H.-Y., Nah A., Chen H., Nakatani Y. und Evans R. M. (1999): A viral mechanism for inhibition of p300 and PCAF acetyltransferase activity. *Cell* **96**: 393-403.

Chang J. Y., Xia W., Shao R. und Hung M.-C. (1996): Inhibition of intratracheal lung cancer development by systemic delivery of E1A. *Oncogene* **13**: 1405-1412.

Chang J. Y., Xia W., Shao R., Sorgi F., Hortobagyi G. N., Huang L. und Hung M.-C. (1997): The tumor suppression activity of E1A in HER-2/neu-overexpressing breast cancer. *Oncogene* **14**: 561-568.

Chen H. und Hung M.-C. (1997): Involvement of co-activator p300 in the transcriptional regulation of the HER-2/neu gene. *J. Biol. Chem.* **272**: 6101-6104.

Chen H., Paradies N.E., Fedor-Chaiken, M. und Brackenbury R. (1997): E-cadherin mediates adhesion and suppresses cell motility via distinct mechanisms. *J. Cell Sci.* **110**: 345-356.

Chen H., Yu D., Chinnadurai G., Karunakaran D. und Hung M.-C. (1997): Mapping of adenovirus 5 E1A domains responsible for suppression of neu-mediated transformation via transcriptional repression of neu. *Oncogene* **14**: 1965-1971.

Chinnandurai G. (1992): Adenovirus E1A as a tumor-suppressor gene. *Oncogene* **7**, 1255-1258.

Chiou S.-K. und White E. (1997): P300 binding by E1A cosegregates with p53 induction but is dispensable for apoptosis. *J. Virol.* **71**: 3515-3525.

Chomczynski P. und Sacchi N. (1987): Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.

Chu G. (1994): Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *J. Biol. Chem.* **269**: 787-790.

Coussens L., Yang-Feng T.L., Kiao Y.C., Chen E., Gray A., McGrath J., Seeburg P.H., Liebermann T.A., Schlessinger J., Francke U., Lavinson A. und Ullrich A. (1985): Tyrosine kinase receptor with extensive homology to the EGF receptor shares chromosomal location with the neu oncogene. *Science* **230**: 7-10.

- Cummings J., Anderson L., Willmott N. und Smyth J.F. (1991):** The molecular pharmacology of doxorubicin in vivo. *Eur. J. Cancer* **27**: 523-535.
- De Both N. J., Vermey M., Dinjens W.N. und Bosman F.T. (1999):** A comparative evaluation of various invasion assays testing colon carcinoma cell lines. *Br. J. Cancer* **8**: 934-941.
- De Groot R.P., Kranenburg O., del Wit L., van den Eijnden-van Raaij J., Mummery C., van der Eb A.J. und Zantema A. (1995):** Adenovirus E1A antagonizes both negative and positive growth signals elicited by transforming growth factor beta 1. *Cell Growth & Differentiation* **6**: 531-540.
- De Stachina E., McCurrach M.E., Zindy F., Shieh S.-V., Ferbeyre G., Samuelson A.V., Prives C., Roussel M.F., Sherr C.J. und Lowe S.W. (1998):** E1A signaling to p53 involves the p19^{ARF} tumor suppressor. *Genes Dev.* **15**: 2434-2442.
- Debbas M. und White E. (1993):** Wild-type p53 mediated apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev.* **7**: 546-554.
- Deng J., Xia W. und Hung M.-C. (1998):** Adenovirus 5 E1A-mediated tumor suppression associated with E1A-mediated apoptosis *in vivo*. *Oncogene* **17**: 2167-2175.
- Dong J.T., Isaacs W.B., Barrett J.C. und Isaacs J.T. (1997):** Genomic organization of the human KAI1 metastasis-suppressor gene. *Genomics* **41**: 25-32.
- Douglas J.L., Gopalakrishnan S. und Quinlan M.P. (1991):** Modulation of transformation of primary epithelial cells by the second exon of the E1A gene. *Oncogene* **6**: 2093-2103.
- Duyndam M.C., van Dam H., Smits P.H., Verlaan M., van der Eb A. J. und Zantema A. (1999):** The N-terminal transactivation domain of ATF2 is a target for the co-operative activation of the c-jun promotor by p300 and 12S E1A. *Oncogene* **8**: 2311-2321.
- Earnshaw W.C. (1995):** Nuclear changes in apoptosis. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **7**: 337-343.

Egan C., Bayley S.T. und Branton P.E. (1989): Binding of the RB1 protein products to E1A products is required for adenovirus transformation. *Oncogene* **4**: 383-388.

Fearnhead H. O., Rodriguez J., Govek E.-E., Guo W., Kobayashi R., Hannon G. und Lazebnik Y. A. (1998): Oncogene-dependent apoptosis is mediated by caspase-9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 13664-13669.

Ferguson B., Krippel B., Andrisani O., Jones N., Westphal H. und Rosenberg M. (1995): 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.

Fourney R. M., Miyakoshi J., Day R. S. und Paterson M.C. (1988): Northern Blotting: Efficient RNA staining and transfer. *Focus* **10(1)**: 5-7.

Freedman V.H. und Shin S.I. (1974): Cellular tumorigenicity in nude mice correlation with cell growth in semi-solid medium. *Cell* **3**: 355-359.

Frisch S.M. (1991): Antioncogenic effect of adenovirus E1A in human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9077-9081.

Frisch S.M. (1994): E1A induces the expression of epithelial characteristics. *J. Cell Biol.* **127**: 1085-1096.

Frisch S.M. (1997): The epithelial cell default-phenotype hypothesis and its implications for cancer. *BioEssays* **19**: 705-709.

Frisch S.M. und Dolter K.E. (1995): Adenovirus E1A-mediated tumor suppression by a c-erbB-2/neu-independent mechanism. *Cancer Res.* **55**: 5551-5555.

Frisch S.M., Francis H. (1994): Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* **124**, 619-626.

Frisch S.M., Reich R., Collier I.E., Genrich L.T., Martin G. und Goldberg G.I. (1990): Adenovirus E1A represses protease gene expression and inhibits metastasis of human tumor cells. *Oncogene* **5**: 75-83.

Fritsche M., Haessler C. und Brandner G. (1993): Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene* **8**, 307-318.

Gazdar A.F., Steinberg S.M., Russel E.K., Linnoila R.I., Oie H.K., Ghosh B.C., Coelingam J.D., Johnson B.E., Minna J.D. und Ihde D.C. (1990): Correlation of in vitro drug-sensitivity testing results with response to chemotherapy and survival in extensive-stage small cell lung cancer: a prospective clinical trial. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**: 117-124.

Girad D.J., Aaronson S.A., Todaro G.J., Arnstein P., Kersey J.H., Dosink H. und Parks W.P. (1973): In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Nat. Cancer Inst.* **51**: 1417-1423.

Goldman P.S., Tran V.K. und Goodman R.H. (1997): The multifunctional role of the co-activator CBP in transcriptional regulation. *Recent Progress in Hormone Research* **52**: 103-120.

Gopalakrishnan S. und Quinlan M. P. (1995): Modulation of E-Cadherin localization in cells expressing wild-type E1A 12S or hypertransforming mutants. *Cell Growth & Differentiation* **6**: 985-998.

Graham F.L., Smiley J., Russell W.C. und Nairn R. (1977): Characterization of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**: 59-72.

Gu W., Shi X.-L. und Roeder R.G. (1997): Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* **387**: 819-823.

Guo M. und Hay B.A. (1999): Cell proliferation and apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**: 745-752.

Haack A., Poller W., Schneider-Rasp S., Thalmheimer P., Schmitt G., Hanfland P., Brackmann H. und Schwaab R. (1999): Highly sensitive and species-specific assay for quantification of human transgene expression levels. *Haemophilia* **5**: 334-339.

Hagmeyer B. M., König H., Herr I., Offringa R., Zantema A., van der Eb A. Herrlich P. und Angel P. (1993): Adenovirus E1A negatively and positively modulates transcription of AP-1 dependent genes by dimer-specific regulation of the DNA binding and transactivation activities of Jun. *EMBO J.* **12**: 3559-3572.

Hahn W.C., Counter C.M., Lundberg A.S., Beijerbergen R.L., Brooks M.W. und Weinberg R.A. (1999): Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* **400**: 464-468.

Hale T.K. und Braithwaite A.W. (1999): The adenovirus oncoprotein E1a stimulates binding of transcription factor E2F to transcriptionally activate the p53 gene. *J. Biol. Chem.* **274(3)**: 23777-23786.

Haley K.P., Overhauser J., Babiss L.E., Ginsberg H.S. und Jones N.C. (1984): Transformation properties of type 5 adenovirus mutants that differentially express the E1A gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 5734-5738.

Hamamori Y., Sartorelli V., Ogryzko V., Puri P.L., Wu H.Y., Wang J.Y.J., Nakatani Y. und Keddes L. (1999): Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein Twist and adenoviral oncoprotein E1A. *Cell* **96**: 405-413.

Harley C.B., Futcher A.B. und Greider C.W. (1990): Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**: 458-460.

Harlow E. und Lane D. (1988): In *Antibodies: A Laboratory Manual*. CSH Laboratory Press, CSH, New York, USA.

Hennache B. und Boulanger P. (1977): Biochemical study of KB cell receptor of adenovirus. *Biochem. J.* **166**: 237-247.

Horikawa I., Cable P.L., Afshari C. und Barrett J.C. (1999): Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene. *Cancer Res.* **59**: 826-830.

Hortobagyi G.N., Hung M.C. und Lopez-Berestein G. (1998): A Phase I multicenter study of E1A gene therapy for patients with metastatic breast cancer and

epithelial ovarian cancer that overexpresses HER-2/neu or epithelial ovarian cancer. *Hum. Gene Ther.* **9**: 1775-1798.

Horwitz M.S. (1990): In: *Virology* (2nd ed.), (ed. B.N. Fields), D.M. Knipe *et al.* Raven Press, New York, USA: 1679-1721.

Houweling A., van den Elsen P.J. und van der Eb A.J. (1980): Partial transformation of primary rat cells by the left most 4,5% fragment of adenovirus 5 DNA. *Virology* **105**: 537-550.

Jahnknecht R. und Hunter T. (1996): A growing coactivator network. *Nature* **383**: 22-23.

Jansen-Dürr, P. (1996): How viral oncogenes make the cell cycle. *Trends in Genetics* **12**: 270-275.

Jelsma T.N., Howe J.A., Mymryk J.S., Eveleigh C.M., Cuniff N.F.A. und Bayley S.T. (1989): Sequences in E1A proteins of human adenovirus 5 required for cell transformation, repression of a transcriptional enhancer, and induction of proliferating cell nuclear antigen. *Virology* **171**: 120-130.

Jones N. und Shenk T. (1979): An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other early viral genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 3665-3669.

Kastan M.B., Onyekwere O., Sidransky D., Vogelstein B. und Craig R.W. (1991): Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* **51**: 6304-6311.

Kaufmann S.H., Desnoyers S., Ottiviano Y., Davidson N.E. und Poirier G.G. (1993): Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* **53**: 3976-3985.

Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L. und Shay J.W. (1994): Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**: 2011-2015.

- Kirch H.-C., Flaswinkel S., Rumpf H., Brockmann D. und Esche H. (1999):** Expression of the human p53 requires synergistic activation of transcription from the p53 promotor by AP-1, NF- κ B and Myc/Max. *Oncogene* **18**, 2728-2738.
- Kischkel F.C., Hellbarth S., Behrmann I. Germer M., Pawlita M., Krammer P.H. und Peter M.E. (1995):** Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* **15**: 5579-5588.
- Kiyokawa N., Yan D.-H., Brown M.E. und Hung M.-C. (1995):** Cell-cycle-dependent regulation of p185^{neu}: A relationship between disruption of this regulation and transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 1092-1096.
- Kumar S. (1995):** ICE-like proteases in apoptosis. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 198-202.
- Kuppuswamy M. und Chinnadurai G. (1988):** Cell type dependent transformation by adenovirus 5 E1a proteins. *Oncogene* **2**: 567-572.
- Laemmli U. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lazebnik Y.A., Kaufmann S.H., Desnoyers S., Poirier G.G. und Earnshaw W.C (1993):** Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**: 346-347.
- Levine A.J. (1993):** The tumor suppressor genes. *Annu. Rev. Biochem.* **62**: 623-651.
- Lill N.L., 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.
- Lillie J.W., Green M. und Green M.R. (1986):** An adenovirus E1a protein region required for transformation and transcriptional repression. *Cell* **46**: 1043-1051.
- Lillie J.W., Loewenstein P.M., Green M.R. und Green M. (1987):** Functional domains of adenovirus type 5 E1A proteins, *Cell* **50**, 1091-1100.

Linzer D.I. und Levine A.J. (1979): Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **17**: 43-52.

Londberg-Holm K. und Philipson L. (1969): Early events of virus-cell interactions in an adenovirus system. *J. Virol.* **4**: 323.

Lowe S.W. und Ruley H.E. (1993): Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus-5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev.* **7**: 535-545.

Lowe S.W., Jacks T., Housman D.E. und Ruley H.E. (1994): Abrogation of oncogene-associated apoptosis allows transformation of p53-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2026-2030.

Lowe S.W., Ruley H.E., Jacks T. und Housman D.E. (1993): p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* **74**: 957-967.

Lyons R.H. Ferguson B.Q., Rosenberg M. (1987): Pentapeptide nuclear localization signal in adenovirus E1a. *Mol. Cell Biol.* **7**, 2451-2456.

Macpherson I. und Montagnier L. (1964): Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus. *Virology* **23**: 291-294.

Mashimo T., Watabe M., Hirota S., Hosobe S., Miura K., Tegtmeyer P.J., Rinker-Shaeffler C.W. und Watabe K. (1998): The expression of the KAI1 gene, a tumor metastasis suppressor is directly activated by p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 11307-11311.

Meyerson M., Counter C.M., Eaton E.N., Ellisen L.W., Steiner P. und Caddle S.D. (1997): hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is upregulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* **90**: 785-795.

Mignatti P. und Rifkin D.B. (1993): Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol. Rev.* **73**: 161-195.

Montell C., Courtois G., Eng C. und Berk A. (1994): Complete transformation by adenovirus 2 requires both E1A proteins. *Cell* **36**: 527-538.

Moran E. (1994): Mammalian cell growth controls reflected through protein interactions with the adenovirus E1A gene products. *Seminars in Virology* **5**: 327-340.

Moran E., Grodzicker T., Roberts R.J., Mathews M.B. und Zerler B. (1986a): Lytic and transforming functions of individual products of the adenovirus E1A gene. *J. Virol.* **57**: 765-775.

Moran E., Zerler B., Harrison T.M. und Mathews M.B. (1986b): Identification of separate domains in the adenovirus E1A gene for immortalization activity and the activation of virus early genes. *Mol. Cell Biol.* **6**: 3470-3480.

Mullis K., Falcoona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. und Erlich H. (1992): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Biotechnology* **24**: 17-27.

Muzio M., Stockwell B.R., Stennicke H.R., Salvesen G.S. und Dixit V.M. (1998): An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* **30**: 2926-2930.

Mymryk J.S. (1996): Tumour suppressive properties of the adenovirus E1A oncogene. *Oncogene* **13**: 1581-1589.

Mymryk J.S., Lee R.W.H. und Bayley S.T. (1994): Induction of apoptosis by adenovirus type 5 E1A in rat cells requires a proliferation block. *Oncogene* **9**: 1187-1193.

Nakajima T., Morita K., Tsundona H., Imajoh-Ohmi S., Tanaka H., Yasuda H. und Oda K. (1998): Stabilization of p53 by adenovirus E1A occurs through its aminoterminal region by modification of the Ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* **273**: 20036-20045.

Nakayama J., Tahara E., Saito M., Ito K., Nakamura H., Nakanishi T., Tahara E., Ide T. und Ishikawa F. (1998): Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nat. Genet.* **18**: 65-68.

Nelson W.G. und Kastan M.B. (1994): DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol. Cell Biol.* **14**: 1815-1823.

Nevins J.R. (1998): Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth & Differentiation* **9**: 585-593.

Nevins J.R., Ginsberg H.S., Blanchard J.M., Wilson M.C. und Darnell J.E. (1979): Regulation of the primary expression of the early adenovirus transcription units. *J. Virol.* **32**: 727-733.

Nguyen M., Branton P.E., Roy S., Nicholson D. W., Alnemri E. S., Yeh W.-C., Mak T. W. und Shore G. C. (1998): E1A-induced processing of procaspase-8 can occur independently of FADD and is inhibited by Bcl-2. *J. Biol. Chem.* **273**: 33099-33102.

Nicholson D.W., Ali A., Thornberry N.A., Vaillancourt J.P., Ding C.K., Gallant M., Gareau Y., Griffin P.R., Labelle M., Lazebnik Y.A., Munday N.A., Raju S.M., Samuelson M.E., Yamin T.T., Yu V.L. und Miller D.K. (1995): Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**: 37-43.

Norrby E., Bartha A. und Boulanger P. (1976): Adenoviridae. *Intervirolog.* **7**: 117-125.

Offringa R., Gebel S., van Dam H., Timmers M., Smits A., Zwart R., Stein B., Bos J.L., van der Eb A. und Herrlich P. (1990): A novel function of the transforming domain of E1a: repression of AP-1 activity. *Cell* **62**: 527-538.

Offringa R., Smits A.M., Houweling A., Bos J.L. und van der Eb A.J. (1988): Similar effects of adenovirus E1A and glucocorticoid hormones on the expression of the metalloprotease stromelysin. *Nucleic Acids Res.* **16**: 10973-10984.

Paal K., Baeuerle P.A. und Schmitz M.L. (1997): Basal transcription factors TBP und TFIIB and the viral coactivator E1A 13S bind with distinct affinities and kinetics to the transactivation domain of NF-kappaB p65. *Nucleic Acids Res.* **25**: 1050-1055.

Parker S.F., Felzien L.K., Perkins N.D., Imperiale M.J. und Nabel G.J. (1997): Distinct domains of adenovirus E1A interact with specific cellular factors to differentially modulate human immunodeficiency virus transcription. *J. Virol.* **71**: 2004-2012.

- Pei R. und Berk A.J. (1989):** Multiple transcription factor binding sites mediate adenovirus E1A transactivation. *J. Virol.* **63**: 3499-3506.
- Persson H. und Philipson L. (1982):** Regulation of adenovirus gene expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **97**: 157-203.
- Philipson L., Londberg-Holm K., Peterson U. (1968) :** Virus-receptor interaction in an adenovirus system. *J. Virol.* **2**, 1064-1075.
- Pozzatti R, Muschel R., Williams J., Padmanabhan R., Howard B., Liotta L., Khoury G. (1986):** Primary rat embryo cells transformed by one or two oncogenes show different metastatic potentials. *Science* **232**, 223-227.
- Roelvink P.W., Lizonova A., Lee J.G.M., 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 the Adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E and F. *J. Virol.* **72**: 7908-7915.
- Roth J.A. und Cristiano R.J. (1997):** Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going? *J. Natl. Cancer Inst.* **89**: 21-39.
- Rowe W. P., Huebner R. J., Gillmore L.K., Parrott R.H. und Ward T.G. (1953):** Isolation of cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* **84**: 570-573.
- Ruley H.E. (1983):** Adenovirus early region enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* **304**, 602-606.
- Samuelson A.V. und Lowe S.W. (1997):** Selective induction of p53 and chemosensitivity in RB-deficient cells by E1A mutants unable to bind the RB-related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 12094-12099.
- Sanchez Y., el-Naggar A., Pathak S. und Killary A.M. (1994):** A tumor suppressor locus within 3p14-p12 mediates rapid cell death of renal cell carcinoma in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 3383-3387.
- Sánchez-Prieto R., Leonart M. und Ramón y Cajal S. (1995):** Lack of correlation between p53 protein level and sensitivity to DNA-damaging agents in keratinocytes carrying adenovirus E1A mutants. *Oncogene* **11**: 675-682.

Sánchez-Prieto R., Quinatanilla M., Martín P., Lleonart M., Cano A., Dotto G.P. und Ramón y Cajal S. (1998). In vivo antitumor effect of retrovirus-mediated gene transfer of the adenovirus E1A gene. *Cancer Gene Ther.* **5**: 215-224.

Sano Y., Tokitou F., Dai P., Maekawa T., Yamamoto T. und Ishii S. (1998): CBP alleviated the intramolecular inhibition of ATF-2 function. *J. Biol. Chem.* **273**: 29098-29105.

Santoro M., Battaglia C., Zhang L., Carlomagno F., Martelli M.L., Salvatore D. und Fusco A. (1994): Cloning of the rat tissue inhibitor of metalloproteinase type 2 (TIMP-2) gene: analysis of its expression in normal and transformed thyroid cells. *Exp. Cell Res.* **213**: 398-403.

Schaak J. und Shenk T. (1989): Adenovirus terminal protein mediated efficient and timely activation of viral transcription. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **144**: 185-190.

Schaeper U., Boyd J.M., Verma S., Uhlmann E., Subramanian T. und Chinnadurai G. (1995, 1998): Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved carboxyterminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; **92**:10467-10471. Published erratum appears in *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; **95**: 14584.

Schaeper U., Subramanian, T., Lim L., Boyd J.M. und Chinnadurai G. (1998): Interaction between a cellular protein that binds to the C-terminal region of Adenovirus E1A (CtBP) and a novel cellular protein is disrupted by E1A through a conserved PLDLS motif. *J. Biol. Chem.* **273**: 8549-8552.

Schechter A.L., Hung M.-C., Vaidyanathan L., Weinberg R.A., Yang-Feng T.L., Francke U., Ullrich A. und Coussens L. (1985): The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* **229**: 976-978.

Schneider J.F., Fisher F., Goding C.R. und Jones N.C. (1987): Mutational analysis of the adenovirus E1a gene: the role of transcriptional regulation in transformation. *EMBO J.* **6**: 2053-2060.

- Sethi T., Rintoul R.C., Moore S.M., MacKinnon A.C., Salter D., Dhoo S., Chilvers E.R., Dransfield I., Donnelly S.C., Strieter R., Haslett C. (1999):** Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: A mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance *in vivo*. *Nature Med.* **5**, 662-668.
- Shenk T. (1996): Adenoviridae: The viruses and their replication.** *Fundamental Virology*, Third edition: 979-1016.
- Shih I.M. und Herlyn M. (1993):** Role of growth factors and their receptors in the development and progression of melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **100**: 196S-203S.
- Slansky J.E. und Farnham P.J. (1996):** Introduction to the E2F family: protein structure and gene regulation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **208**: 1-30.
- Somasundaram K. und El-Deiry W.S. (1997):** Inhibition of p53-mediated transactivation and cell cycle arrest by E1A through its p300/CBP-interacting domain. *Oncogene* **14**: 1047-1057.
- Somasundaram K., Jayaraman G., Williams T., Moran E., Frisch S. und Thimmapaya B. (1996):** Repression of a matrix metalloprotease gene by E1A correlates with its ability to bind to cell type-specific transcription factor AP-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 3088-3093.
- Southern E. (1975):** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Steeg P.S., Bevilacqua G., Pozzatti R., Liotta L.A. und Sobel M.E. (1988):** Altered expression of NM23, a gene associated with low tumor metastatic potential, during adenovirus 2 E1a inhibition of experimental metastasis. *Cancer Res.* **48**: 6550-6554.
- Steeg P.S., Bevilacqua G., Kopper L., Thorgeirsson U.P., Talmadge J.E., Liotta L.A. und Sobel M.E. (1988):** Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J. Natl. Cancer Inst.* **80**: 200-204.
- Stein R.W., Corrigan M., Yaciuk P., Whelan J. und Moran E. (1990):** Analysis of E1A-mediated growth regulation functions: binding of the 300-kilodalton cellular

product correlates with E1A enhancer repression function and DNA synthesis-inducing activity. *J. Virol.* **64**: 4421-4427.

Stephens C. und Harlow E. (1987): Differential splicing yields novel adenovirus 5 E1A mRNA that encode 30 kD and 35 kD proteins. *EMBO J.* **6**: 2027-2035.

Ström A.-C., Ohlsson P. und Akusjärvi G. (1998): AR1 is an integral part of the adenovirus type 2 E1A-CR3 Transactivation domain. *J. Virol.* **72**: 5978-5983.

Struhl K. (1998): Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev.* **12**: 599-606.

Subramanian T., La Regina M. und Chinnadurai G. (1989): Enhanced ras oncogene mediated cell transformation and tumorigenesis by adenovirus 2 mutants lacking the C-terminal region of E1a protein. *Oncogene* **4**: 415-420.

Sun H.C., Tang Z.Y., Zhou G. und Li X.M. (1998): KAI1 gene expression in hepatocellular carcinoma and its relationship with intrahepatic metastasis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **17**: 307-311.

Sundquist A., Sollerbrant K. und Svensson C. (1998): The carboxy-terminal region of adenovirus E1A activates transcription through targeting of a C-terminal binding protein-histone deacetylase complex. *FEBS Letters* **429**: 182-188.

Tackeichi M. (1993): Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**: 806-811.

Takahashi T., Carbone D., Takahashi T., Nau M.M., Hida T., Limmoila I., Veda R. und Minna J.D. (1992): Wild-type but not mutant p53 suppresses the growth of human lung cancer cells bearing multiple genetic lesions. *Cancer Res.* **52**: 2340-2343.

Takaoka A., Hinoda Y., Satoh S., Adachi Y., Itoh F., Adachi M. und Imai K. (1998): Suppression of invasive properties of colon cancer cells by a metastasis suppressor KAI1 gene. *Oncogene* **16**: 1443-1453.

Tao W. und Levine A.J. (1999): P19^{ARF} stabilizes p53 by locking nucleocytoplasmatic shuttling of Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 6937-6941.

- Teodoro J.G., Shore G.C. und Branton P.E. (1995):** Adenovirus E1A proteins induce apoptosis by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene* **11**: 467-474.
- Thomas P. G., und Matthews M.G. (1980):** DNA replication and the early to late transition in adenovirus infection. *Cell* **22**: 523-533.
- Tremblay M.I., McGlade C.j., Gerber G.E. und Branton P.E. (1989):** Identification of phosphorylation sites in the exon 1 of E1A proteins of adenovirus type 5 by amino acid sequencing of peptide fragments. *J. Biol. Chem.* **263**: 6375-6383.
- Van den Elsen P., de Pater S., Houweling A., van der Veer J. und van der Eb A. (1982):** The relationship between region E1a and E1b of human adenovirus in cell transformation. *Gene* **18**: 175-185.
- Van Groningen J.J.M., Cornelissen I.M.A.H., van Muijen G.N.P., Bloemerts H.P.J. und Swart G.W.M. (1996):** Simultaneous suppression of progression marker genes in the highly malignant human melanoma cell line BLM after transfection with the adenovirus-5 E1A gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **225**: 808-816.
- Van Muijen G.N., Cornelissen L.M., Jansen C.F., Figdor C.G., Johnson J.P., Brocker E.B. und Ruiter D.J. (1991):** Antigen expression of metastasizing and non-metastasizing human melanoma cells xenografted into nude mice. *Clin. Exp. Metastasis* **9**: 259-272.
- Van Ormondt H., Maat J. und Dijkema R. (1986):** Comparison of nucleotide sequences of the early E1A regions for subgroups A, B and C of human adenoviruses. *Gene* **12**: 63-76.
- Wang H., Draetta G. und Moran E. (1991):** E1A induces phosphorylation of the retinoblastoma protein independently of direct physical association between the E1A and retinoblastoma products. *Mol. Cell Biol.* **12**: 4353-4265.
- Wang Y., Blandino G. Oren M. und Givol D. (1998):** Induced p53 expression in a lung cancer cell line promotes cell senescence and differentially modifies the cytotoxicity of anti-cancer drugs. *Oncogene* **17**: 1923-1930.

- Wang Z.Q., Auer G., Stingl L., Berghammer H., Haidacher D., Schweiger M. und Wagner E.F. (1995):** Mice lacking ADRPT and poly(ADP-ribosyl)ation develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes Dev.* **9**: 509-520.
- White E. (1993):** Regulation of apoptosis by the transforming genes of the DNA tumor virus adenovirus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **204**: 30-39.
- Whyte P., Ruley H.E. und Harlow E. (1988):** Two regions of the adenovirus early region 1A proteins are required for transformation. *J. Virol.* **62**: 257-265.
- Whyte P., Williamson N.M. und Harlow E. (1989):** Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell* **56**: 67-75.
- Wyllie A.H. (1989):** Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**: 251-306.
- Yamamoto T., Ikawa S., Akiyama T., Semba K., Nomura N., Miyajima N., Saito T. und Toyoshima K. (1986):** Similarity of protein encoded by the human c-erbB-2 gene to epidermal growth factor. *Nature* **319**: 226-230.
- Yan D.H., Chang L.S. und Hung M.-C. (1991):** Repressed expression of the HER-2/c-erbB-2 proto-oncogene by the adenovirus E1a gene products. *Oncogene* **6**: 343-345.
- 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.
- Yew P.R. und Berk A.J. (1992):** Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature* **357**: 82-85.
- Yu D., Hamada J., Zhang H., Nicholson G.L. und Hung M.-C. (1992):** Mechanism of c-erbB2/neu oncogene-induced metastasis and repression of metastatic properties by adenovirus 5 E1A gene product. *Oncogene* **7**: 2263-2270.
- Yu D., Matin A., Hinds P.W. und Hung M.-C. (1994):** Transcriptional regulation of neu by RB and E1A in Rat-1 cells. *Cell Growth Differ.* **5**:431-438.

- Yu D., Matin A., Xia W., Sorgi F., Huang L. und Hung M.-C. (1995):** Liposome-mediated *in vivo* E1A gene transfer suppressed dissemination of ovarian cancer cells that overexpress HER-2/*neu*. *Oncogene* **11**: 1383-1388.
- Yu D., Scorsone K. und Hung M.-C. (1991):** Adenovirus Type 5 E1A gene products act as transformation suppressors of the *neu* oncogene. *Mol. Cell. Biol.* **11(3)**: 1745-1750.
- Yu D., Shi D., Scanlon M. und Hung M.-C. (1993b):** Reexpression of *neu* encoded oncoprotein counteracts the tumor-suppressing but not the metastasis-suppressing function of E1A. *Cancer Res.* **53**: 5784-5790.
- Yu D., Suen T.-C., Yan D.-H., Chang L.-C. und Hung M.-C. (1990):** Transcriptional repression of the *neu* protooncogene by the adenovirus 5 E1A gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4499-4503.
- Yu D., Wolf J.K., Scanlon M., Price J.E. und Hung M.-C. (1993a):** Enhanced *c-erbB-2/neu* expression in human ovarian cancer cells correlated with more severe malignancy that can be suppressed by E1A. *Cancer Res.* **15**: 891-898.
- Yu Y., Yang J.L., Markovic B., Jackson P., Yardley G., Barrett J. und Russell P.J. (1997):** Loss of KAI1 messenger RNA expression in both high-grade and invasive human bladder cancers. *Clin. Cancer Res.* **3**: 1045-1049.
- Zambetti G.P. und Levine A.J. (1993):** A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. *FASEB J.* **7**: 855-865.
- Zhang Y., Yu D., Xia W. und Hung M.-C. (1995):** HER-2/*neu* targeting cancer therapy via adenovirus-mediated E1A delivery in an animal model. *Oncogene*, **10**, 1947-1954.
- Zhong H., Voll R.E. und Ghosh S. (1998):** Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol. Cell* **1**: 661-671.

8 PUBLIKATIONEN

Alexandra Dickopp, Helmut Esche, Bertram Opalka, Hans-Christoph Kirch: Transformation defective adenovirus 5 E1A mutants with tumor suppressive properties in the highly metastatic BLM human melanoma cell line. 1999 Tumor Virus Meeting on Papovaviruses, Papillomavirus and Adenovirus, Cambridge, England.

Alexandra Dickopp, Helmut Esche, Guido Swart, Siegfried Seeber, Hans-Christoph Kirch and Bertram Opalka: Transformation defective adenovirus 5 E1A mutants exhibit improved antioncogenic properties in human BLM melamoma cells. Eingereicht bei *Cancer Gene Therapy* (in Revision).

9 LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Alexandra Dickopp
 Geburtsdatum: 16.12.1970
 Geburtsort: Mülheim an der Ruhr
 Familienstand: ledig

Schulbildung:

1977-1981 Grundschule in Mülheim an der Ruhr
 1981-1990 Karl-Ziegler-Gymnasium in Mülheim an der Ruhr
 28.05.1990 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

10/1990-09/1991 Studium der Biologie (Diplom) an der Technischen Universität Karlsruhe
 10/1991-10/1995 Studium der Biologie (Diplom) an der Philipps-Universität Marburg
 10/1995-11/1995 Mündliche Diplomprüfungen
 12/1995-12/1996 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Stoffwechselphysiologie der biologischen Fakultät der Universität Marburg
 19.12.1996 Abschluss als Diplom-Biologin mit der Gesamtnote „Sehr gut“
 Seit 04/1997 Promotion am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung)
 04/1997-06/1998 Mitglied des Graduiertenkollegs: "Normale und maligne Zellen"
 Seit 06/1998 Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung)

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 „Evaluation der Tumorsuppressoraktivität transformationsdefekter Adenovirus-Serotyp 5 E1A-Mutanten „ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Alexandra Dickopp 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 _____

Alexandra Dickopp

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 _____

Alexandra Dickopp