

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung)

**Funktionelle Interaktion von E1A-Onkoproteinen mit
Chromatin-remodellierenden Faktoren bei der
Transkriptionsregulation des zellulären PCNA-Gens**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Alexandra Schwan
aus Essen

2009

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Forsting
1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. rer. nat. H. Esche
2. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. A. Ehrenhofer-Murray

Tag der mündlichen Prüfung: 03. März 2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	7
1.1 DNA-Tumoviren als Modellsystem der zellulären Transformation	7
1.2 Systematik der Adenoviren	8
1.3 Die produktive (lytische) Infektion	10
1.4 Die abortive Infektion.....	12
1.5 Struktur und Genprodukte der E1A- Region des onkogenen Serotyps Ad 12	12
1.6 Zelluläre Transkriptionsfaktoren als Ziele der E1A- gesteuerten Transkriptionsregulation.....	14
1.7 Das Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)	16
1.8 Chromatinstruktur und Regulation der Genexpression	17
1.9 Interaktion der E1A- Proteine mit den Chromatin-remodellierenden Faktoren	19
1.10 Zielsetzung	20
 2. Material.....	 21
2.1 Chemikalien.....	21
2.2 Spezielle Geräte und Zubehör	22
2.3 Puffer und Lösungen	24
2.4 Spezielle Software	25
2.5 Oligonukleotide	26
2.6 Bakterienstämme und Zelllinien.....	27
2.7 Verwendete Vektoren.....	28
2.7.1 Reporterplasmide	28
2.7.2 Expressionsplasmide.....	28
2.8 Enzyme	29
2.9 Antikörper.....	30
2.10 Kultivierungsmedien	30
2.10.1 Medium und Zusätze für die Säugerzellen- Kultivierung.....	30
2.10.2 Medien für die E.-coli Kultivierung.....	31
2.11 Kits und spezielle Reagenzien.....	31
2.12 Molekulargewichtstandards.....	32
2.13 Filme, Filter, Membranen und besondere Verbrauchsmaterialien	32

3. Methoden	33
3.1 Labortechnische Sicherheit.....	33
3.2 Zellbiologische Techniken	33
3.2.1 Zellkultur.....	33
3.2.1.1 Kultivierung von Zelllinien	34
3.2.1.2 Kryokonservierung und Reaktivierung von Zellen	34
3.2.1.3 Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer.....	34
3.2.1.4 Mycoplasmentest.....	35
3.2.2 Transfektion eukaryontischer Zellen.....	35
3.2.2.1 Lipofektion	35
3.2.2.2 Elektroporation	36
3.2.3 Reporter-gen-Assays	37
3.2.3.1 Luciferase-Assays.....	37
3.3 Molekularbiologische Techniken	39
3.3.1 Bakterienkultur.....	39
3.3.1.1 Kultivierung und Lagerung von Escherichia coli (E.-coli).....	39
3.3.1.2 Präparation kompetenter E.-coli Bakterien.....	39
3.3.1.3 Transformation kompetenter E.-coli Bakterien	40
3.3.2 Isolierung und Charakterisierung von Plasmid-DNA	41
3.3.2.1 Mini- und Maxi- Präparationen	41
3.3.2.2 DNA-Quantifizierungen	41
3.3.3 Modifikation von DNA-Sequenzen	42
3.3.3.1 Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	42
3.3.3.2 Dephosphorylierung von 5'-Phosphatenden.....	42
3.3.3.3 Native Agarosegele.....	42
3.3.3.4 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	43
3.3.3.5 Reinigung von PCR-Produkten	44
3.3.3.6 Ligation von DNA.....	44
3.3.4 Amplifikation von DNA-Sequenzen.....	44
3.3.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
3.3.4.2 Identifizierung Insert-positiver Bakterienklone mittels PCR-Screening	46
3.3.5 Mutagenese von DNA-Sequenzen	47
3.3.5.1 pGEM®-T Easy Vector Systems.....	47
3.3.5.2 QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit.....	47
3.4 Proteinbiochemische Techniken.....	49
3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	49

3.4.2	Herstellung von Gesamtzell-Proteinextrakten aus Säugerzellen	50
3.5	Protein- Protein- Interaktionsanalysen	50
3.5.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	50
3.5.2	Western Blotting	51
4.	Ergebnisse	53
4.1	Der PCNA- Promotor als zelluläres Modellsystem der funktionellen Interaktion von E1A und der ATPase BRG1 des SWI/SNF-Komplexes	54
4.2	Klonierung geeigneter Promotor- Reporterkonstrukte zur Analyse der funktionellen Interaktion von E1A mit hBRG1 (SWI/SNF) in transienten Expressionsexperimenten	55
4.3	Beteiligung ATP-abhängiger Chromatin-remodellierender Faktoren (hBRG1, hBRM) sowie der E1A- Proteine bei der Aktivierung des zellulären PCNA- Promotors	57
4.3.1	Für die PCNA-Promotoraktivität ist ein intaktes CRE-Motiv erforderlich	59
4.3.2	Bedeutung der Ausbildung eines funktionellen ternären Komplexes aus CREB, p300/CBP, und E1A _{12S} an das CRE-Element des Promotors für die Aktivierung des PCNA minimal Promotors	60
4.3.2.1	Transiente Expressionsexperimente mit einer dominant-negativen CREB-Mutante (A-CREB).....	60
4.3.2.2	Transiente Expressionsexperimente mit einer E1A _{12S} - Mutante (Δ 1-79/E1A _{12S}) nach Deletion der aminoterminal gelegenen 79 Aminosäuren (N-Terminus und CR1)	61
4.3.3	Zusammenhang zwischen den HAT- Komplexen (p300/CBP; PCAF) und der hBRG1- vermittelten Aktivierung des PCNA- Promotors.....	62
5.	Diskussion	65
5.1	Interaktion der ATPase-Untereinheiten hBRG1 und hBRM der Chromatin-remodellierenden hSWI/SNF-Komplexe mit dem E1A _{12S} Protein bei der Aktivierung des PCNA- Promotors	66
5.2	Der hSWI/SNF- abhängige Aktivierungsmechanismus des PCNA- Promotors	69

6. Zusammenfassung.....	74
7. Literaturverzeichnis.....	75
Abkürzungsverzeichnis	95
Tabellenverzeichnis	101
Danksagungen.....	102
Curriculum Vitae.....	103

1. Einleitung

„Das ureigenste Wesen eines Virus ist seine fundamentale Verquickung mit der genetischen und metabolischen Maschinerie seines Wirtes.“ (Joshua Lederberg, 1993)

Seit ihrer Entdeckung in den fünfziger Jahren (Rowe *et al.*, 1953), dienen Adenoviren und ihre Wirtszellen als exzellente experimentelle Systeme, um komplizierte eukaryontische Prozesse wie das Spleißen von RNA (Berk und Sharp, 1978), die Verpackung von DNA mit Histonen in Nukleosomen (Gariglio *et al.*, 1979), die Zellzyklus-Regulation und diverse Zellzyklus-regulierende Proteine (z. B. die E2F-Familie) (Koveshdie *et al.*, 1986), sowie die E2F-Funktion inhibierenden „pocket“-Proteine wie p105RB, p107, oder p130, aufzudecken, und funktionell zu charakterisieren. Grundlegende Erkenntnisse der Regulation der eukaryontischen Genexpression durch humanpathogene Adenoviren finden sich bei Brockmann und Esche, 1995, sowie Berk *et al.*, 1998.

In den letzten zehn Jahren wurden im Zuge der stetigen Weiterentwicklung der Gentechnologie erfolgreich Ansätze unternommen, Adenoviren als Vektoren für den Gen-Transfer in Säuger-Zellen, unter anderem zur Vakzination (Babiuk und Tikoo 2000; Shiver *et al.*, 2002), bzw. als Vehikel für den therapeutischen Transfer von p53 zur Therapie maligner Erkrankungen (Kuball *et al.*, 2002; Edelman und Nemunaitis, 2003), einzusetzen. Darüber hinaus sind auch Ansätze im Hinblick auf den therapeutischen Einsatz von DNA, welche für das adenovirale E1A- Protein kodiert, beschrieben (Deissler und Opalka, 2007).

1.1 DNA-Tumoviren als Modellsystem der zellulären Transformation

Viren besitzen weder eigene energieproduzierende Stoffwechselapparate, noch makro-molekulare Synthesemaschinerien, die eine eigenständige Virusvermehrung ermöglichen. Um sich replizieren zu können, sind sie auf die Syntheseleistungen der infizierten Zellen angewiesen, die sie durch virale Genprodukte (Onkoproteine) zu Gunsten der eigenen Replikation modifizieren. Unter anderem deregulieren DNA-Tumoviren den Zellzyklus, die Expression wichtiger zellulärer Gene, und die Fähigkeit der Wirtszelle, in die Apoptose zu gehen. Folge dieser Deregulationen durch virale Proteine ist in einigen Fällen die zelluläre Transformation und Bildung von Virus-induzierten Tumoren. Verantwortlich hierfür sind im Falle der Adenoviren die Funktionen der viralen Genprodukte der Regionen E1A und E1B.

Die funktionelle Analyse dieser viruskodierten Tumorantigene ist von großem Interesse, um grundsätzliche Prinzipien der Genregulation, der Proliferationskontrolle, Differenzierung und

Apoptose zu untersuchen. Im Vordergrund steht dabei die Identifizierung zellulärer Faktoren, die mit den viralen Onkogenen interagieren, die Aufklärung der Mechanismen zur Modulation ihrer Funktion, sowie die Identifikation solcher regelhaften Abläufe.

1.2 Systematik der Adenoviren

Die humanpathogenen Adenoviren (Ad) gehören zur Familie der Adenoviridae, welche sich in die Genera Aviadenovirus (Vogel-Adenoviren), und Mastadenovirus (Säuger-Adenoviren) gliedert. Die humanen Adenoviren des Genus Mastadenovirus werden nach DNA-Sequenzhomologie, Hämagglutinations-Reaktionen mit Ratten- und Rhesusaffen-Erythrozyten, Analysen des Restriktionsenzymverdaus (der viralen DNA), der Polypeptid-Zusammensetzung des Virions, sowie nach dem Ausmaß der Onkogenität in Nagern in sechs Subgenera (A bis F) eingeteilt (als Übersicht s. Bailey und Mautner, 1994). Inzwischen sind 56 humanpathogene Adenovirus-Genotypen beschrieben worden (Jothikumar *et al.*, 2005). Die „stark“ onkogenen Adenoviren (z. B. Typ 12) induzieren nach kurzer Latenzperiode Tumorwachstum in syngenem Nagetieren, und werden in die Onkogenitätsgruppe A eingestuft. Zur Subgruppe B zählen „schwach“ onkogene Adenoviren (z. B. Typ 7), die nur bei einer kleinen Zahl der infizierten Tiere nach einer langen Latenz-Periode Tumorwachstum hervorrufen können. Adenoviren wie Ad 5 und Ad 2, bei denen kein onkogenes Potential nachgewiesen werden konnte, gehören zur Subgruppe C (Wadell, 1984). Alle Adenovirus-Serotypen können jedoch nicht permissive Ratten- und Hamsterzellen *in vitro* transformieren. An diesem Unterschied in der Fähigkeit der Viren, im Tier Tumore zu erzeugen, zeigt sich die Bedeutung des Immunsystems, das manche derartige Tumore kontrollieren kann. In den Tumorzellen bzw. transformierten Zellen liegen die viralen Genome entweder als vollständiges Genom, oder fragmentiert und teilweise deletiert, im Wirtsgenom integriert vor.

Adenoviren rufen beim Menschen meist harmlos verlaufende Infektionen wie z. B. epidemische Keratokonjunktivitiden (meistens hervorgerufen durch Adenovirus Typ 8), Infektionen des Respirationstraktes (Typ 1; 2), oder Gastroenteritiden hervor (Übersicht bei Horwitz, 1990).

Ein kausaler Zusammenhang mit menschlichen Tumoren wurde, da sich Adenoviren in humanen Zellen produktiv vermehren und die infizierte Zelle zerstören, bisher nicht nachgewiesen. Es werden allerdings kontroverse Diskussionen über die Beteiligung der E1A-Onkoproteine der Adenoviren bei der Genese des Ewing-Sarkoms geführt (Sanchez-Prieto *et al.*, 1999; Melot und Delattre, 1999; Kovar *et al.*, 2000; Meric *et al.*, 2000).

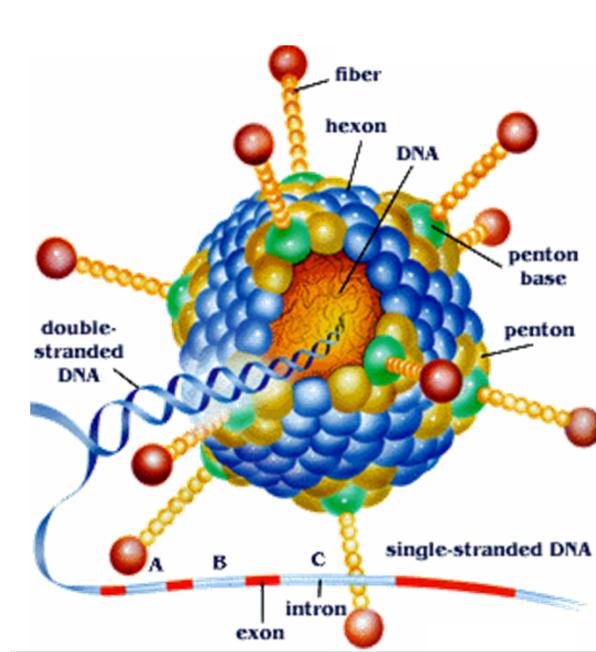


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Adenovirus-Partikels (nach Akusjärvi, 1993).

Das Virion der Adenoviren hat einen Durchmesser von 80 bis 110 nm. Es sind Capside ohne Membranhülle, welche eine ikosaederförmige Proteinhülle mit 20 Seitenflächen und zwölf Ecken besitzen. Sie setzen sich aus 252 Capsomeren zusammen, i. e. 240 Hexoncapsomere und zwölf Pentoncapsomere (Übersicht bei Philipson, 1983). Als Hexone werden die Capsomere der Ikosaedersseitenflächen bezeichnet, da sie an sechs Nachbarcapsomere angrenzen. Zwölf Hexone bilden jeweils eine Capsidseitenfläche. Die Ecken werden von Pentonen gebildet, bestehend aus einer Pentonbasis und einem Fiberproteinanteil. Der Name weist auf ihre fünfeckige Form und die fünf Nachbarkapsomere der Seitenflächen hin, mit denen sie verbunden sind. Die Pentonbasis ist ein Pentamer des viralen Strukturproteins pIII (80kD). Mit jeder der zwölf Pentonbasen ist ein Fiberprotein (pIV, 62 kD), bestehend aus einem trimeren Proteinkomplex, assoziiert. Dieses Fiberprotein ragt an den Ecken jeweils 9 bis 30 nm hervor, und trägt an seinem Ende eine knöpfchenförmige Struktur. Wie wir heute wissen, nutzt die Mehrzahl der humanen Adenoviren u. a. den sog. Coxsackie-Adenovirus Rezeptor (CAR) als primären Rezeptor für die Adsorption und den Eintritt in die Wirtszelle (Stevenson *et al.*, 1995; Bergelson *et al.*, 1997; Roelvink *et al.*, 1998). Die Interaktion der Penton-Proteine mit einem Rezeptor der α V-Integrin-Rezeptor-Familie führt zur Rezeptor-vermittelten Endozytose des Virions im Bereich Clathrin-reicher Regionen in Form von sog. „Clathrin coated pits“ (als Übersicht s. Cullan, 2001). Die Fiber-Proteine werden dabei abgestoßen. Die Pentonbasis dagegen wird mit der Virusfreisetzung aus den Endosomen in Zusammenhang gebracht (Yoshimura *et al.*, 1993). Ausgelöst durch das saure Milieu kommt es zu einer Konformationsänderung der Pentonbasis, in der Folge könnten hydrophobe Domänen zur Disruption der endosomalen Membran beitragen (Wohlfart, 1988). Dieses Uncoating bewirkt die

Freisetzung des Virus-Core in das Cytoplasma. Das Adenovirus-Genom, bestehend aus einem linearen doppelsträngigen DNA-Molekül von 36-38 kbp, wird anschließend in den Kern der Wirtszelle transportiert.

1.3 Die produktive (lytische) Infektion

Humane Zellen sind permissiv für Adenoviren, ihre Infektion verläuft produktiv. Dabei ist der lytische Infektionszyklus der Adenoviren sehr effektiv, jede infizierte Zelle produziert etwa 100.000 Viruspartikel, zusätzlich werden große Mengen überschüssiger viraler DNA und Proteine synthetisiert, die nicht in Virione verpackt werden. Ein Infektionszyklus benötigt 32 bis 36 Stunden, wobei die frühe Phase mit der Expression der early-(E) Gene bereits nach sechs bis neun Stunden komplettiert ist (Zhang, 1992). Diese frühen Ereignisse des produktiven Infektionszyklus beginnen mit der Transkription des E1A-Gens, dessen Genprodukt transaktivierend auf die Expression der anderen frühen viralen Gene E1B, E2, E3 und E4 wirkt, und eine Expressionskaskade der frühen Gene einleitet. Abb. 2 zeigt schematisch das virale Genom und seine Transkriptionskarte. An den Enden der DNA liegen zusätzlich inverse terminale Repetitionen (ITR) mit den DNA-Polymerase-Bindungssequenzen für den Start der DNA-Replikation, gefolgt vom DNA-Verpackungssignal Ψ , vor.

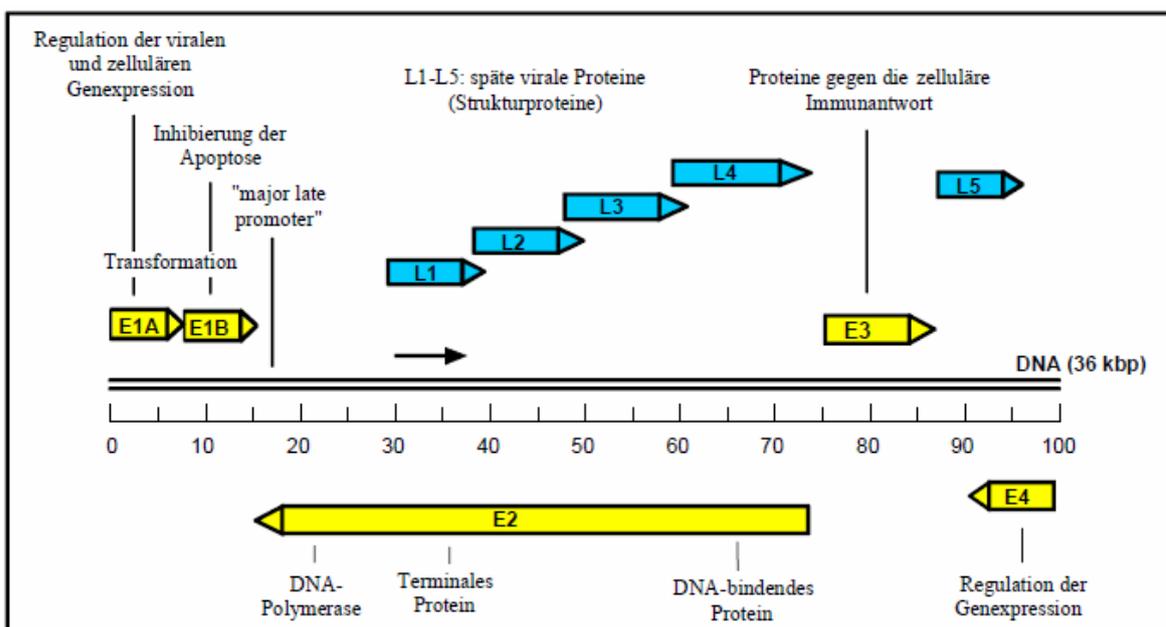


Abb. 2: Schematische Darstellung der Organisation des Genoms humanpathogener Adenoviren. Das lineare doppelsträngige DNA-Molekül der Adenoviren wird in „map units“ (1-100) unterteilt. Die Transkriptionseinheiten gliedern sich in frühe („E“ = early; E1-E4) und späte („L“ = late; L1-L5) Regionen. Die Regionen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

Die Transkriptionskontrolle jeder der frühen Regionen E1-E4 unterliegt einem eigenen Promotor, die Transkription erfolgt durch die zelluläre RNA-Polymerase-II an dem jeweils codogenen DNA-Strang. Die Genprodukte der frühen viralen Regionen sind für die virale Genexpression (Regionen E1A, E1B, E4), die virale DNA-Replikation (Region E2), sowie für die Umprogrammierung des zellulären Syntheseapparates (Regionen E1A, E1B, E4) im Sinne einer effektiven Virusvermehrung, absolut essentiell. Die Genprodukte der E1A Region regulieren sowohl die Expression der viralen, als auch die Transkription einer Vielzahl zellulärer Gene (Übersichten bei Brockmann und Esche, 1995; sowie Gallimore und Turnell, 2001). Im Hinblick auf die vorliegende Arbeit ist insbesondere die Interaktion mit dem Promotor des humanen „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA) zu nennen (Mathews *et al.*, 1984). Die E1B-Region kodiert für Proteine (z. B. 19 kDa und 55 kDa), die unter anderem für die Akkumulation, die Stabilisierung, den Transport, sowie die selektive Expression viraler mRNAs, zuständig sind (Pilder *et al.*, 1986; Zhang *et al.*, 1992; Gabler *et al.*, 1998).

Desweiteren stellt die Inhibition der TNF α -induzierten Apoptose (Gooding *et al.*, 1991; White *et al.*, 1992) eine wichtige Funktion der E1B-Proteine im lytischen Zyklus dar. Die E2-Region ist ebenfalls in zwei separate Transkriptionseinheiten unterteilt. E2A kodiert für ein Protein, welches an einzelsträngige DNA bindet (DBP), und für die DNA-Replikation benötigt wird. E2B kodiert für einen Vorläufer des terminalen kovalent gebundenen Proteins, sowie für eine DNA-Polymerase (Sussenbach und van der Vliet, 1983). Die E3-Region ist an der Modulation der Infektionsabwehr durch den Wirt beteiligt. Sie kodiert für ein Protein, welches den MHC-Transport an die Plasmamembran blockiert (Burgert *et al.*, 1987), sowie für ein zweites Protein, welches die Lyse Adenovirus-infizierter Zellen durch den Tumornekrosefaktor TNF inhibiert (Gooding *et al.*, 1988). Die E4-Region kodiert für Proteine, die an der Regulation der viralen und der zellulären Genexpression, dem Spleißprozess, sowie dem Zusammenbau der Viruspartikel beteiligt sind. Weiterhin induzieren sie in Kooperation mit den E1B-Proteinen die selektive Akkumulation viraler RNA (Shenk, 1996).

Der frühen Transkription folgt ca. acht bis zehn Stunden nach Infektion die DNA-Replikation, mit der die späte Phase des produktiven Infektionszyklus einsetzt. Alle späten Gene, die in der Hauptsache für Strukturproteine des Virions kodieren, werden von einem gemeinsamen sog. „major late“- Promotor transkribiert (Fields, 1985). Von einer nukleären Vorläufer-RNA, werden durch alternatives Spleißen mehr als 20 späte mRNAs prozessiert, welche sich in fünf Familien (L1-L5) gliedern (s. Abb. 2). Sie kodieren für virale Strukturproteine (z. B. Fiber, Capsomere), bzw. ihre Vorläufer (als Übersicht s. Flint und Broker, 1981). Nach der Synthese der späten Proteine werden diese für den Zusammenbau der infektiösen Virionen in den Zellkern transportiert (Horwitz *et al.*, 1969). Die Induktion der Zellyse und die Freisetzung der produzierten Viruspartikel (bis zu 10^5 Viren pro Zelle) erfolgt mit Hilfe des sog. „Adenovirus Death Protein“ (ADP), ein ca. 11 kDa großes, durch die E3-Region kodiertes, Protein.

1.4 Die abortive Infektion

Im Gegensatz zu humanen Zellen sind Nagetierzellen im Allgemeinen nicht permissiv oder für manche humane Adenoviren semipermissiv. Ein Charakteristikum der Adenovirus 12-Infektion in Nagetieren ist der strikt abortive Zyklus. Die Blockierung der Ad 12-Replikation liegt dabei vor der viralen DNA-Replikation und der Transkription der späten Gene. Der Eintritt des Virus in die Zelle, sowie der Transport der viralen DNA in den Zellkern, sind zwar weniger effizient, jedoch werden die meisten frühen Genregionen exprimiert, wenn auch in geringerem Ausmaß. Die Replikation viraler DNA und die Expression später Gene bleibt jedoch aus (Esche und Siegmann, 1982; Doerfler 1969): es werden keine infektiösen Viruspartikel gebildet. Ähnlich wie bei der produktiven Infektion kommt es zumindest zu einer partiellen Integration des Virusgenoms in die zelluläre DNA. Durch eine konstitutive Expression der Genprodukte der E1A- und E1B-Region kann die abortive Infektion in 10^6 bis 10^5 Fällen zu einer Transformation der infizierten Zelle führen (van der Eb und Bernards, 1984).

1.5 Struktur und Genprodukte der E1A-Region des onkogenen Serotyps

Ad 12

Die Region E1A, lokalisiert am äußersten linken Ende des adenoviralen Genoms (0 - 11,5 %), wird nach Infektion der Wirtszelle als erste Transkriptionseinheit exprimiert (Lewis und Mathews 1980; Nevins *et al.*, 1979). Wenigstens sechs verschiedene mRNAs werden durch alternatives Spleissen von einer gemeinsamen Ad12 E1A hnRNA gebildet, und entsprechend ihren Sedimentationskoeffizienten als 13S, 12S, 11S, 10S, 9.5S, sowie 9S, bezeichnet (Perricaudet *et al.*, 1980; Sawada und Fujinaga, 1980; Brockmann *et al.*, 1990). Alle gebildeten mRNAs besitzen dasselbe 5` und 3` Ende, unterscheiden sich jedoch durch die Menge eliminerter Intronsequenzen, welche durch den Spleissprozess entfernt wurden. Von den prozessierten mRNAs werden mindestens fünf verschiedene Proteine translatiert, welche entsprechend der Anzahl ihrer Aminosäure-, „Reste“ (Residues) als 266R (13S mRNA), 235R (12S mRNA), 106R (11S und 10S mRNA), 52R (9.5S mRNA) und 53R (9S mRNA) bezeichnet werden. Die in der frühen viralen Infektion sowie in transformierten Zellen von den dominierenden 13S und 12S E1A mRNAs kodierte Proteine besitzen dieselben N- und C-terminalen Aminosäuresequenzen, und unterscheiden sich lediglich durch 31 fehlende Aminosäuren der Cystein-reichen Region CR3 (Boulanger und Blair, 1991; Shenk und Flint, 1991), deren kodierende RNA-Sequenzen (nt 976 bis nt 1069) bei der 12S mRNA herausgespleißt wurden. Es handelt sich dabei um eine von vier E1A-Domänen, die unter den verschiedenen Adenovirus-Serotypen hochkonserviert sind, und als konservierte Regionen 1-4 (CR 1-4) (Kimelman, 1986; Avvakumov 2002), bezeichnet werden. Zusammen mit dem nicht-konservierten N-Terminus der

E1A- Proteine sind es gerade diese Regionen, welche die Bindung an zelluläre Faktoren, und damit die genregulatorischen Funktionen der Ad12- E1A- Transkriptionseinheit, ermöglichen. Alternative Spleissvorgänge führen zur Verschiebung des Leserasters und Expression kleinerer E1A- Proteine (106R, 52R), die mit den genannten grösseren Genprodukten lediglich im Bereich des N-Terminus (29 Aminosäuren) Sequenzhomologien aufweisen, und unterschiedliche carboxyterminale Sequenzen besitzen (Brockmann und Esche, 1995). Aufgrund eines gemeinsamen Stopcodons vor der zweiten Spleissstelle kodieren 11S und 10S mRNA für das gleiche Protein (106R).

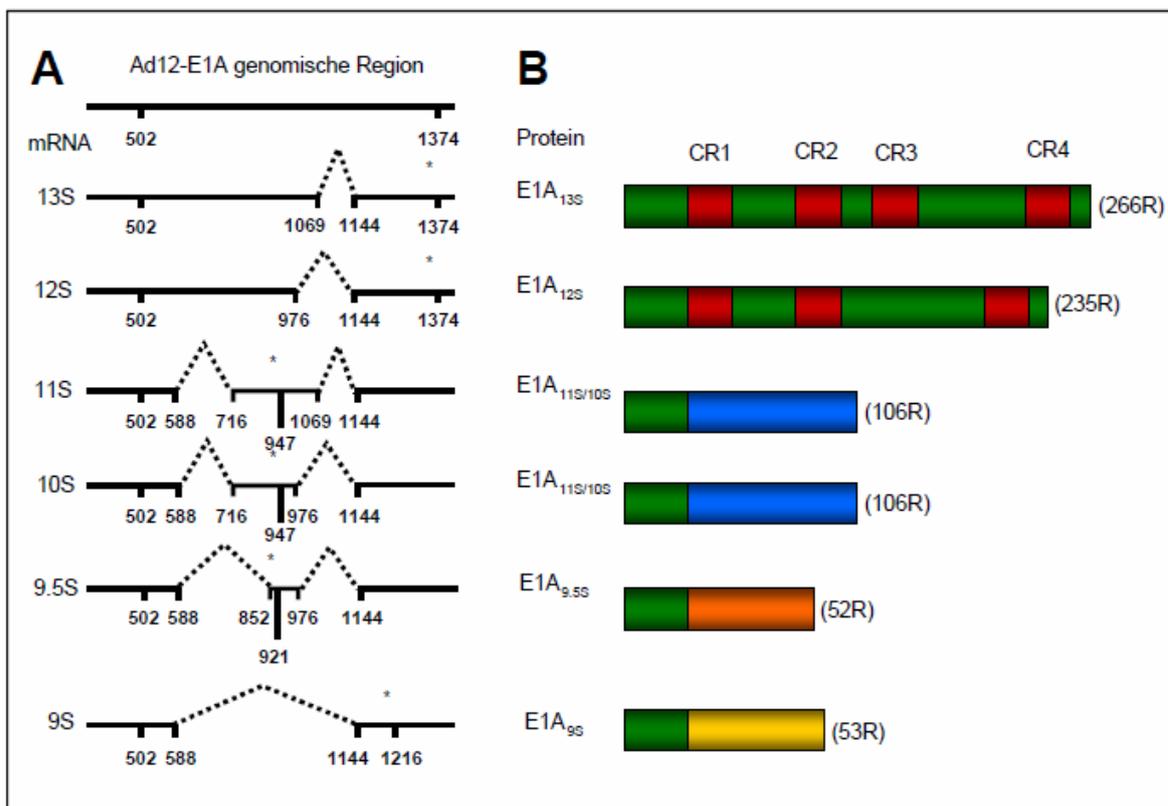


Abb. 3: Struktur der mRNAs (A) und der davon abgeleiteten Proteine (B) der Region E1A des hochonkogenen Adenovirus Serotyp 12. Die Zahlen unter den Linien in Abb. 3 A geben die Positionen der Nukleotide im Adenovirus-Genom an. Sie bezeichnen die Lage des gemeinsamen Startkodons, der Spleißstellen und der Stopkodone. Die gestrichelten Linien weisen auf Introns hin, die „Sternchen“ markieren den Stopcodon- Bereich. Die roten Regionen in Abb. 3 B stellen Proteindomänen dar, die zwischen Ad12 und anderen Adenovirus Serotypen in ihrer Aminosäuresequenz hochkonserviert sind (CR1 bis CR4). Die verschiedenen farbigen Bereiche der E1A-Proteine weisen auf unterschiedlich genutzte Leserahmen hin, die bei der Synthese der Ad12 E1A- Proteine genutzt werden (nach Brockmann und Esche, 1995). (S) Svedberg-Einheit; (R) Aminosäurerest

1.6 Zelluläre Transkriptionsfaktoren als Ziele der E1A- gesteuerten Transkriptionsregulation

Genprodukte der E1A- Region der Adenoviren sind potente Transkriptionsfaktoren. Im lytischen Zyklus sind sie zunächst entscheidend an der Transkriptionsregulation aller anderen adenoviralen Transkriptionseinheiten beteiligt (Berk *et al.*, 1979; Jones und Shenk, 1979; Nevins, 1981), induzieren aber auch die Expression spezifischer zellulärer Gene (Shenk and Flint, 1991). Letztere können sowohl positiv (z. B. PCNA, hsp70, oder c-jun) als auch negativ (z. B. Insulin, Fibronectin, Kollagen) durch E1A- Proteine moduliert werden. Da zumindest weder die durch 12S und 13S mRNA generierten E1A- Proteine eine den klassischen Transkriptionsfaktoren ähnliche intrinsische sequenzspezifische DNA-Bindeaktivität besitzen (Ferguson *et al.*, 1985), noch die bekannten E1A-sensitiven Promotoren eine gemeinsame Nukleotid-Sequenz besitzen, erfüllen die E1A- Proteine ihre Funktionen über eine Interaktion mit zellulären Transkriptionsfaktoren. Diese können prinzipiell in vier Hauptklassen untergliedert werden:

(1) Generelle Transkriptionsfaktoren

Für die spezifische Transkriptionsinitiierung sind neben der RNA-Polymerase II sog. generelle Transkriptionsfaktoren und Mediator Komplexe (als Übersicht s. Berk, 1998) notwendig. E1A-Proteine können z. B. durch die Zinkfinger-Transaktivierungsdomäne CR3 mit diesen generellen Transkriptionsfaktoren interagieren, und eine effiziente Steuerung der viralen und zellulären Genexpression in infizierten Zellen erreichen. So konnten z. B. Interaktionen der Zinkfinger-Transaktivierungsdomäne CR3 sowohl mit Komponenten des TFIID-Komplexes wie TBP und TAFs (Brockmann und Esche, 1995; Jones 1995), als auch über den N-Terminus (AS 1 - 29) mit der RAP 30-Untereinheit des generellen Transkriptionsfaktors TFIIF nachgewiesen werden (Lipinski *et al.*, 1998). Vermutlich trägt E1A durch diese Interaktionen mit Komponenten der TFII-Komplexe unter anderem zur Stabilisierung des sog. Prä-Initiationskomplexes (PIC) an Zielpromotoren bei (Brockmann *et al.*, 2001).

(2) DNA-Sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren

DNA-bindende Transkriptionsfaktoren, wie z. B. CREB-1 und ATF-1, dienen als Adaptoren für E1A- Proteine am Zielpromotor (s. Abb. 4). Die Interaktion mit ihnen bewirkt i. d. R. eine Transkriptionsaktivierung solcher Zielgene, die ein sog. cAMP-responsive element (CRE; CRE-Konsensussequenz: TGACGTCA) in ihrem Promotor tragen (Montminy *et al.*, 1987). Weitere zur bZIP-Subfamilie gehörende DNA-bindende Transkriptionsfaktoren, die mit E1A- Proteinen interagieren, sind ATF-2 und c-Jun, die Homo- und Heterodimere bilden können, und an die

Konsensussequenz (TGACTCA) des 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat Response Element (TRE) vieler Promotoren binden (Shaywitz und Greenberg, 1999; Angel und Karin, 1991).

(3) Zelluläre Repressorproteine

Zu den bisher bekannten sequenzspezifischen Repressorproteinen gehören z. B. die sog. „pocket-Proteine“ wie das Retinoblastom-Protein p105RB, p107 und p130, welche an den sequenzspezifischen Transkriptionsfaktor E2F binden. Durch Interaktion mit diesem E2F-Faktor inhibiert z. B. das RB-Protein, ein wichtiger Faktor der Zellzyklusregulation, den Übergang der Zelle von der G1 in die S-Phase (als Übersicht s. Adams und Kaelin, 1998). Die Bindung des E1A_{12S}- Proteins mit der CR1- und CR2-Domäne an das RB-Protein des inhibitorischen E2F/pRB-Komplexes führt zur Freisetzung von transkriptionsaktivem E2F (Ikeda und Nevins, 1993). Die Folge ist eine Aktivierung proliferationsrelevanter, E2F-abhängiger Zielgene, wie z. B. der Thymidinkinase oder Dihydrofolatreduktase, welche für die Neusynthese von DNA-Nukleotiden im lytischen Entwicklungszyklus der Adenoviren unbedingt erforderlich sind (Zhang und Dean, 2001).

(4) Zelluläre Koaktivatoren

Zelluläre Koaktivatoren wie z. B. p300/CBP und PCAF stellen entscheidende Integratoren verschiedener zellulärer Signaltransduktionswege dar, indem sie den Kontakt zwischen Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie und DNA-sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren durch Acetylierung und Phosphorylierung herstellen, und modifizieren (als Übersicht s. Janknecht und Hunter, 1996). Diese Koaktivatoren haben keinen direkten DNA-Kontakt und werden durch ihre Interaktion mit sequenzspezifischen, DNA-gebundenen, Transkriptionsfaktoren an den Promotor rekrutiert. Daraus kann sowohl eine Aktivierung, als auch eine Repression der Transkription von Zielgenen resultieren. Zum Beispiel kann die p300/CBP-assoziierte Transkriptionsaktivierung von E1A aufgehoben werden (Arany *et al.*, 1995; Bannister und Kouzarides, 1996; Lundblad *et al.*, 1995). Der Mechanismus ist höchstwahrscheinlich eine durch den N-Terminus und die CR1-Domäne von E1A induzierte Sequestration von p300/CBP von Promotor- assoziierten Transkriptionsfaktorkomplexen. Ähnliche Mechanismen wurden für die Repression p53- (Somasundaram und El-Deiry, 1997), c-Jun- (Lee *et al.*, 1996), und c-Fos-abhängiger Gene beschrieben (Bannister und Kouzarides, 1996).

Zur Transkriptionsrepression PCAF-abhängiger Gene (PCAF = p300/CBP-assoziiertes Faktor) kann es sowohl durch die Konkurrenz der E1A- Proteine mit PCAF um die Bindung an p300/CBP kommen (Yang *et al.*, 1996), als auch durch eine direkte Bindung von E1A an PCAF (Reid *et al.*, 1998), wodurch u. a. die Zelldifferenzierung, z. B. im Sinne der Myogenese (Puri *et al.*, 1998)

unterdrückt werden kann. Somit ist E1A in der Lage, unabhängig an zwei verschiedene HATs (p300/CBP und PCAF) zu binden, und ihre Aktivität zu modulieren.

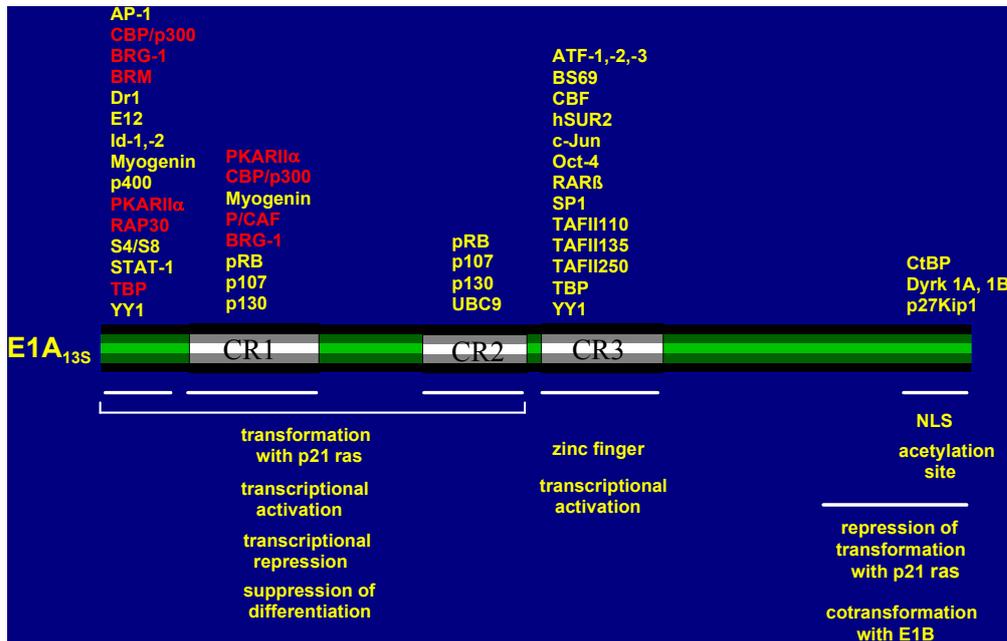


Abb. 4: Interaktion zellulärer Faktoren mit dem E1A- Protein. Das schematische Diagramm zeigt das E1A_{13S}-Protein. Die grauen Rechtecke stellen die konservierten Regionen 1 bis 3 (CR1-CR3) dar. Die bis heute bekannten Interaktionsbereiche für zelluläre Faktoren mit dem E1A- Protein sind mit grauen Linien gekennzeichnet. Im Text erwähnte Faktoren: TBP und TAFs (TBP associated factors) sind Komponenten des basalen Transkriptionsfaktorkomplexes, ATFs, c-Jun, und CREB (nicht dargestellt) sind sequenzspezifische DNA-Bindeproteine; p105RB, p107, und p130 gehören zur Familie der Pocketproteine; CtBP (carboxy-terminal binding protein) ist ein Korepressor; Dr1 ist ein Repressor des TBP Proteins; CBP/p300, p400 und PCAF gehören zu den zellulären Koaktivatoren. Die für die Regulation zellulärer Gene durch den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg insbesondere relevanten Interaktionspartner sind rot unterlegt (nach Brockmann *et al.*, 2001).

1.7 Das Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)

Das humane PCNA wurde als ein 35.000 kDA Protein erstmals durch seine Reaktion mit Autoantikörpern im Kontext des systemischen Lupus erythematoses identifiziert (Mathews *et al.*, 1984). In vivo ist PCNA für die Zellzyklusprogression sowohl in Hefen als auch in Säugerzellen erforderlich, und trägt somit maßgeblich zur Genomstabilität bei (Liu *et al.*, 1989). Zuerst von Travali und Mitarbeitern isoliert (Travali *et al.*, 1989), stellt das Proliferating Cell Nuclear Antigen einen essentiellen Prozessierungsfaktor für die eukaryontische DNA-Replikation und -Reparatur dar. Erstmals konnte 1993 die Aktivierung des PCNA- Promotors durch E1A_{243R} über das cis-regulatorische PERE-Element (PERE = PCNA E1A-Responsive Element) nachgewiesen werden (Labrie *et al.*, 1993). Zum Verständnis der PCNA-Regulation ist die Assoziation der PERE-Region des Promotors mit den Transkriptionsfaktoren ATF-1, CREB und RFX1, sowie die Modifikation durch zelluläre Proteine wie CBP und den Tumorsuppressor p107,

von Bedeutung. Auch die Suppression der Zelltransformation durch p57 (Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor) setzt die Bindung an PCNA voraus.

Der Genlocus des PCNA-Gens liegt auf Chromosom 20p12, die Größe beträgt 4961 bp. Das Gen liegt in einer Einzelkopie mit 6 Exons vor:

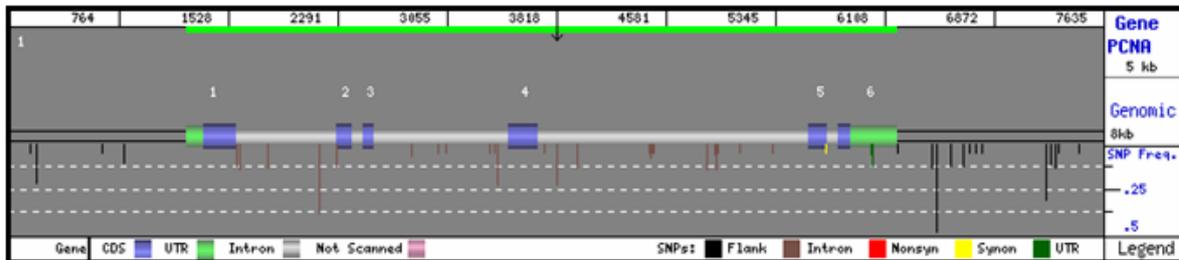


Abb. 5: Genstruktur des Proliferating Cell Nuclear Antigen. PCNA ist ein Cofaktor der DNA Polymerase Delta, sein Auftreten korreliert mit dem Proliferationsstatus der Zelle (Paunesku *et al.*, 2001). Das Genprodukt ist durch die Evolution hinweg hochkonserviert und seine Funktion in der DNA-Replikation essentiell. Auf molekularer Ebene agiert PCNA möglicherweise im Sinne eines „sliding clamp“-Mechanismus, um die Effektivität der DNA-Synthese zu verbessern (Tan *et al.*, 1986).

1.8 Chromatinstruktur und Regulation der Genexpression

Im Zellkern eukaryontischer Zellen liegt die mit Histonproteinen assoziierte DNA in kompakter Form, die als Chromatin bezeichnet wird, vor. Die Grundverpackungseinheit des Chromatins ist das Nukleosom, ein Komplex aus DNA (ca. 150 bp), gewunden um einen Kern aus Histonproteinen. Der nukleosomale Kern ist ein stabiles Oktamer, bestehend aus je zwei H2A- und H2B-Dimeren, und einem H3/H4-Heterotetramer (Kornberg und Lorch, 1999). Die Nukleosomen sind in regelmäßigen Abständen auf der DNA angeordnet. Die internukleosomalen DNA-Bereiche sind mit H1-Histonen (Linker-Histonen) assoziiert (Wolffe, 1995). Durch die Assoziation mit Linker-Histonen sowie einer Reihe von Non-Histonproteinen, wie z. B. HMG-Proteine, wird die nukleosomale Anordnung in einer weiteren, kompakteren 30 nm Chromatinfibrille organisiert (Grunstein, 1998). Eine weitere, komplexere Organisationsform der DNA wird durch die Anordnung der Chromatinfibrille in schleifenförmigen Strukturen, welche über ein Proteingerüst (scaffold) mit der Kernmatrix verbunden sind, erreicht (s. Abb. 6). Im Gegensatz zu den Nukleosomen sind der molekulare Aufbau sowie die Struktur der Chromatinfibrille, und ihrer höheren Verpackungsordnungen, bis heute nicht geklärt.

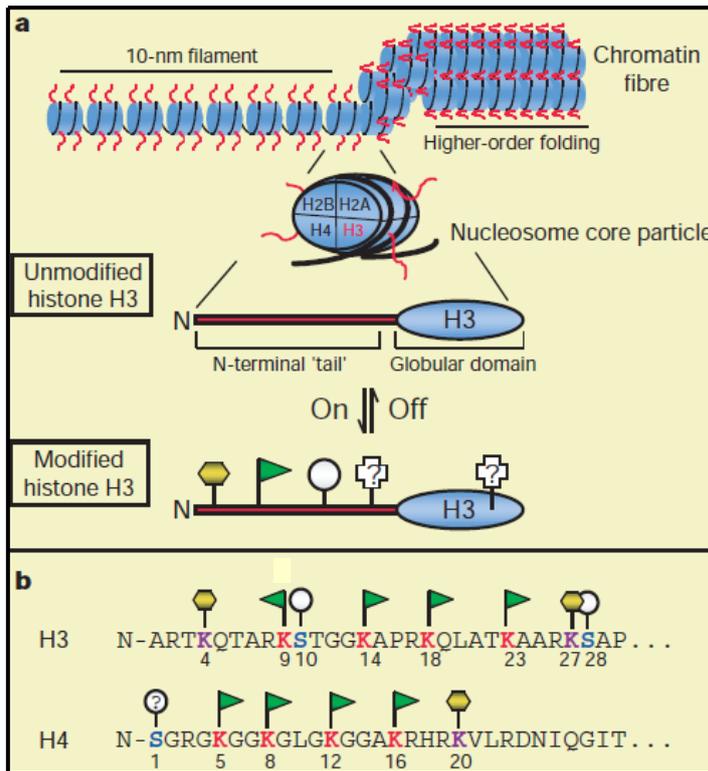


Abb. 6.: Schematische Darstellung der Organisation des Chromatins. (a) Die DNA-Doppelhelix (schwarze Linie) ist um ein Histonoktamer (je zwei Moleküle H2A, H2B, H3, und H4, blau dargestellt) gewunden. Die N-terminalen Enden von Histonproteinen (rot dargestellt) sind Orte der posttranslationalen Modifikationen. Dazu zählen Acetylierung (grüne Fahne), Methylierung (gelbes Hexagon) und Phosphorylierung (weißer Kreis), sowie weitere, teils unbekannte Modifikationen. (b) Die Aminosäuresequenz des N-Terminus weist in regelmäßigen Abständen typische Lysin-Acetylierungsstellen (rot, Lysine 9; 18; und 23), sowie potentielle Phosphorylierungs- (blau), und Methylierungsstellen (violett) auf. Die H1-Histone (nicht dargestellt) sind mit internukleosomalen DNA- Bereichen assoziiert, und für die Organisation der nukleosomalen Anordnung in 30 nm Chromatinfibrillen mitverantwortlich (nach *Strahl und Allis, 2000*).

Studien über die Zugänglichkeit von Genen für die Transkriptionsmaschinerie haben gezeigt, dass Chromatin als hoch-organisierte, kompakte Form der DNA die Transkription inhibiert. Diese Repression wird sowohl durch die nukleosomale Anordnung, als auch durch die höhere Verpackungsordnung in der Chromatinfibrille vermittelt (Peterson, 2000). Durch die Interaktionen von Histonproteinen mit der DNA in den Nucleosomen werden regulatorisch wichtige DNA-Regionen im Promotor besetzt, und für die sequenzspezifisch DNA-bindenden Proteine unzugänglich gemacht. Auch die Nucleosom/Nucleosom-Interaktionen in den Chromatinfibrillen wirken sich auf den Zugang von anderen, im Transkriptionsprozess involvierten, Proteinen limitierend aus.

Die Überwindung dieser Barrieren wird durch die spezifische Rekrutierung von Chromatinremodellierenden Faktoren, deren Aktivität eine Voraussetzung für die Interaktion regulatorischer Proteine, bzw. Proteine der basalen Transkriptionsmaschinerie, mit ihren Zielsequenzen auf der

DNA ist, ermöglicht (Kingston und Narlikar, 1999). Die bis heute bekannten Chromatin-remodellierenden Faktoren können in zwei Klassen unterteilt werden (Berger, 2002; Narlikar *et al.*, 2002):

(1) Zelluläre Faktoren wie p300/CBP, PCAF und andere, welche durch kovalente Modifikationen an den N-terminalen Enden der Histon-Proteine, wie z. B. Acetylierung, Phosphorylierung oder Methylierung, Änderungen in der Chromatinstruktur bewirken. Von den genannten kovalenten Modifikationen stellt die Histonacetylierung den am besten erforschten und am häufigsten mit der Genaktivierung in Verbindung gebrachten Mechanismus dar.

(2) Proteinkomplexe, welche unter Verbrauch von Energie die Änderungen der Chromatinstruktur bewirken, wie z. B. der SWI/SNF-Komplex in humanen Zellen (Roberts und Orkin, 2004) bzw. Hefen (Zhang *et al.*, 2006). Alle diese Komplexe beinhalten Untereinheiten, die eine ATPase-Aktivität besitzen, und die chemische Energie der ATP-Hydrolyse zur Änderung der Chromatinstruktur verwenden (Reisman und Thompson, 2009).

1.9 Interaktion der E1A- Proteine mit den Chromatin-remodellierenden Faktoren

Analog zur zellulären DNA liegt die virale DNA im Kern der Zelle ebenfalls hochkondensiert in einer Chromatin-Struktur vor. Die Kooperation der E1A- Proteine mit Chromatin-remodellierenden Faktoren, wie z. B. ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden Komplexen oder Histonacetyltransferasen, ist daher zur Ausübung ihrer genregulatorischen Funktion von entscheidender Bedeutung. Die Aktivität dieser Faktoren kann durch die E1A- Proteine sowohl direkt, als auch indirekt beeinflusst werden. Hierbei wurde gezeigt, dass die E1A- Proteine bei der Interaktion von p105RB mit Chromatin-remodellierenden Faktoren, wie z. B. Histon-Deacetylasen (HDACs) und hSWI/SNF-Komplexen, interferieren. Die E1A- Proteine sind dadurch in der Lage, die Expression der an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligten Gene zu modulieren, und den p105RB-induzierten Zellzyklusarrest aufzuheben (Strober *et al.*, 1996). Weiterhin sind die E1A- Proteine in der Lage, die Histon-Deacetylasen, durch die Konkurrenz um die Bindung an CtBP (carboxy-terminal binding protein), zu inaktivieren, und damit die Transkription der Zielgene zu aktivieren (Schaeper *et al.*, 1995). Auch die Interaktion von E1A- Proteinen mit p400, einem Mitglied der SWI2/SNF2-Familie, ist für die E1A-vermittelte Transformation von entscheidender Bedeutung (Fuchs *et al.*, 2001). Eine direkte Interaktion mit zellulären Histonacetyltransferasen (HATs), wie z. B. p300/CBP ermöglicht den E1A- Proteinen damit, die Transkription einer Reihe von zellulären, sowie auch seiner viralen Promotoren, zu aktivieren. Ein hervorragendes Beispiel hierfür ist der E2- Promotor des Adenovirus-Serotyp 12 (Fax *et al.*, 2000). Für die Aktivierung des

PKA/CREB-abhängigen E2- Promotors ist die HAT-Aktivität von p300/CBP von entscheidender Bedeutung. p300/CBP wird durch die Interaktion mit dem E1A_{12S}- Protein und den zellulären Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1, welche mit dem E2-CRE (cAMP-response element) assoziiert vorliegen, an den E2-Promotor rekrutiert. Hierbei wird die HAT-Aktivität von p300/CBP durch das E1A_{12S}- Protein aktiviert. Auch für den Faktor BRG1 des ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden SWI/SNF-Komplexes konnte gezeigt werden, dass er mit E1A- Proteinen interagiert. Die Folge ist eine zusätzliche Aktivierung des adenoviralen frühen E2- Promotors.

1.10 Zielsetzung

Analog zum viralen E2- Promotor wird auch der zelluläre PCNA- Promotor über ein Konsensus-CRE- Promotorelement reguliert, und besitzt zudem eine Schlüsselrolle in der Zellzyklusregulation, sowie der DNA-Reparatur (s. Kap. 1.7).

Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe hatten bereits gezeigt, dass E1A- Proteine mit der ATPase-Untereinheit BRG des ATP-abhängigen, Chromatin-remodellierenden hSWI/SNF-Komplexes bei der Modulation und Aktivierung des viralen E2_{Ad12}- Promotors interagieren, und so die Expression CREB-abhängiger viraler Gene in vitro und in vivo regulieren können (R. Hashemi, Dissertationsschrift, 2003).

Analysen bezüglich des Aktivierungsmechanismus des viralen E2_{Ad12}- Modellpromotors über die ATP-abhängigen Chromatin-remodulierenden hSWI/SNF-Komplexe hatten gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen Histonacetylierung durch p300/CBP (aktiviert durch E1A- Funktionen), und der Beteiligung der hSWI/SNF-Komplexe an der Aktivierung des viralen E2_{Ad12}- Promotors besteht, da die Histondeacetylase-1 die hBRG1-vermittelte Aktivierung des adenoviralen E2_{Ad12}- Promotors inhibieren kann.

Meine Aufgabe besteht darin, anhand eines neuen Modellsystems des zellulären, ebenfalls durch E1A- Proteine induzierbaren, PCNA- Promotors zu erarbeiten, ob und in welchen Kaskaden im Aktivierungsprozess dieses Promotors die Rekrutierung der Chromatin-modifizierenden und Chromatin-remodulierenden Faktoren ebenso effizient durch virale E1A- Proteine koordiniert und reguliert werden kann. Um die Aktivierung des PCNA- Promotor in transienten Expressionsanalysen in Gegenwart von E1A_{12S}- und BRG1- Proteinen analysieren zu können, habe ich eine PCNA- Promotorsequenz so in einen Expressionsvektor kloniert, dass ein Reporter-gen, in diesem Fall das Luciferase-Gen, unter die transkriptionelle Kontrolle des PCNA- Promotors gestellt wird.

2. Material

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

2.1 Chemikalien

Acetyl-CoA	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Acrylamid	Biomol, Hamburg
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin (Binotal)	Bayer, Leverkusen
APS	Sigma, Deisenhofen
Bacto Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto Tryptone	Difco, Detroit, USA
Bacto Yeast Extract	Difco, Detroit, USA
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
BSA	Sigma, Deisenhofen
Coomassie Brillant Blau R250	Carl Roth, Karlsruhe
Desoxyribonukleotide	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
DTT	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Riedel- de Haen, Seelze
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Formaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Fluka, Deisenhofen
Glycin	MP Biomedicals, Kalifornien, USA
Lysozyme (Muramidase)	Biomol, Hamburg
Magermilchpulver	Plus, Deutschland
Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
NaCl	Merck, Darmstadt
N, N'-Methylen-bisacrylamid	Sigma, Deisenhofen
NP-40	Fluka, Neu-Ulm
Pefabloc SC	Boehringer, Mannheim
SDS	BioRad, München
Tris	Sigma, Deisenhofen
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe
Tris - HCL	Merck, Darmstadt
TEMED	Plusone, Pharmacia Biotech, Schweden
Transfectin	BioRad, München
Triton-X-100	BioRad, München
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
X- Gal	Sigma, Deisenhofen

Tab. 1: Verwendete Chemikalien

2.2 Spezielle Geräte und Zubehör

CO ₂ - Begasungsbrutschrank	Heraeus GmbH, Hanau, Typ B5060 EK-002
Dampfsterilisator	6-6-9 HS1 Typ LAF 6050 / 6060, SAUTER AG, CH-8583 Sulgen
Elektrophoreseapparatur für Agarosegele	Kodak, Rochester, USA
Mini-Protean-II-Dual-SLAB-Kammer	BioRad, München
Phero-stab.200 Elektrophoresis Power Supply	Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen
ECM 830 Electro Square Porator™	BTX, A Division of Genetronics, Inc.; San Diego, CA 92121 USA
Exsikkator	Nalgene Labware, NY, USA
Gel-Dokumentationssystem Herolab UVT- 20 ME	Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch
Hamilton Spritze	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Kryo-Röhrchen	TPP Techno Plastic Products AG, CH-8219 Trasadingen
Elektroporationsküvetten (4mm),	PeQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Lumat LB 9501	Berthold GmbH, Wildbad
Mixing Rotor Variospeed	Renner GmbH, Dannstadt
Mikroskop	Leitz Labovert FS, Typ 090-127.017 Leica Microsystems AG, Wetzlar
Mikrowelle Typ SS-578H	Siemens, Erlangen
Heidolph Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
pH-Meter HI 9025	Hanna Instruments GmbH, Kehl am Rhein
T3000 Thermocycler	Biometra, München
TRIO- Thermoblock	Biometra, München
Photometer Novaspec® II	Pharmacia Biotech (Biochrom) Ltd., Cambridge, UK
GeneQuant RNA-DNA Calculator	Pharmacia Biotech (Biochrom) Ltd., Cambridge, UK
PP-Test tubes, 50 ml	CELLSTAR, Greiner Bio-One
Sterilbank, Typ VC 2.23.2 S Nr.1	BSH AG, Bad Hersfeld, Baujahr 1975

Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München
Branson Sonifier Cell Disruptor B15	Branson Ultrasonics Corp.1976, Danbury, USA
Vortexer Heidolph Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach No.54119, Ser. No 12984
Transfektionsröhrchen	Becton Dickinson, New York, USA
Precisa 4000 C	Göntgen Mess- und Wägetechnik, Bottrop
Kern Feinwaage, Typ ABS 120- 4	Kern & Sohn GmbH, Balingen- Frommern
Julabo PC- Wasserbad	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Schüttelwasserbad Typ 3047	Köttermann, Essen
6-Loch-Zellkulturschalen mit 3,5 cm Ø Vertiefungen, Zellkulturplatten, -flaschen und -schalen	Becton Dickinson, New York, USA über Oehmen, Essen
eppendorf centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Hettich Mikro Rapid/ K, Nr.1395	Hettich, Tuttlingen
Heraeus Sepatech Biofuge 28 RS	Kendro Laboratory Products, Osterode
Medifuge Typ-Nr. 1206	Heraeus Christ, Osterode
Zentrifugenröhrchen 14 ml	TPP Techno Plastic Products AG, CH- 8219 Trasadingen
Polystyrene Round-Bottom Tube, 5ml	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, N. J., USA
Heraeus Minifuge T	Kendro Laboratory Products, Osterode
Küvette, Mikro, Quarzglas, 0,7ml, Art.X856.1 Type:18/Q/10, Pathlength 10mm	Roth, Karlsruhe

Tab. 2: Spezielle Geräte und Zubehör

2.3 Puffer und Lösungen

Acrylamid/Bisacrylamid- Lösung (37,5 : 1)	29,2 g Acrylamid 0,8 g N,N'-Methylen-Bisacrylamid mit Aqua dest. ad 100 ml
Ampicillin- Lösung	50 mg/ml in Aqua dest.
APS-Lösung	10% (w/v) APS in Aqua dest.
Coomassie Blue-Lösung	50 % Methanol 10 % Essigsäure 2,75 g Coomassie Brillant Blau R250 mit Aqua dest. ad 1000 ml
DNA-Probenpuffer (6x)	150 mM EDTA 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF 30 % (v/v) Glycerin
dNTP-Mix (für PCR)	je 1,25 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP in Aqua dest. (Lagerung bei -20°C)
Ethidiumbromid- Lösung	10 mg/ml in Aqua dest.
Gelentfärber (SDS-PAGE)	10 % Essigsäure 12,5 % Isopropanol
IPTG-Lösung	1 M in Aqua dest. (Lagerung bei -20°C)
LB- Agar	15g Agar in 1000 ml LB-Medium
LB- Agar/Ampicillin	LB-Agar mit 100g/ml Ampicillin
LB-Medium	10g Tryptone 10g NaCl 5g Yeast Extract ad 1000 ml mit Aqua dest. (Lagerung bei 4°C)
NETN-Puffer	20 mM Tris/HCl, pH 8 100 mM KCl 1 mM EDTA 0,5 % NP-40
PBS	4 mM MgSO ₄ 7 mM CaCl ₂ 1,4 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄
PBS=	wie PBS, ohne MgSO ₄ und CaCl ₂
PS-Lösung	1,5 g Penicillin 2,5 g Streptomycinsulfat 2 g NaCl 0,1 g KCl 0,25 g Glucose 0,1 g NaHCO ₃ Mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt

SDS-PAGE-Laufpuffer (1x)	250 mM Tris-HCl, pH 8,3 250 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
SDS-PAGE-Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer (6x)	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
TAE-Puffer (50 x)	2 M Tris Base 1 M Natriumacetat 100 mM EDTA, pH 7,4
TBS-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
TBS- Tween 20	1 x TBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20
TBS-Blockierungspuffer	1 x TBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20 und 10 % (w/v) Magermilchpulver
Transferpuffer (für Western- Blot)	48 mM Tris, pH 7,5 39 mM Glycin 0,037 % (w/v) SDS für Proteine < 180 kDa 0,8 % (w/v) SDS für Proteine > 180 kDa 20 % (v/v) Methanol
VT- Lösung	0,5 M EDTA, 2,5 g/l Trypsin in PBS =

Tab. 3: Puffer und Lösungen

2.4 Spezielle Software

Chromas v 2.3

Technelysium Pty Ltd., Australien

BioEdit v 7.0

Tom Hall, North Carolina University, USA

QuikChange® Primer Design

Stratagene Labtools, La Jolla, USA

2.5 Oligonukleotide

Die in der Folge aufgelisteten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert, entsalzt und lyophilisiert. Sämtliche Oligonukleotide wurden in H₂O aufgenommen, und in einer Verdünnung von 25 pmol/μl eingesetzt.

Name	Sequenz
------	---------

Amplifizierungsprimer:

5'-PCNA-560 (KpnI) 5'-GGG GGG TAC CAA GCT TTA TAC AAT GAA CGA T-3'

PCNA-560 (Kpn I) 5'-AAA AGG TAC CGC GAC GAC CGG CTG AGA CCT A-3'

5'-PCNA-560 (Bgl II) 5'-GGG GAG ATC TAA GCT TTA TAC AAT GAA CGA T-3'

3'-PCNA-560 (Bgl II) 5'-AAA AAG ATC TGC GAC GAC CGG CTG AGA CCTA-3'

5'-PCNA-249 (Hind III) 5'-ATT ACC AAG CTT GAC CCG ATC-3'

3'PCNA-249 (Hind III) 5'-ATT ACC AAG CTT GCG ACG ACC-3'

5'PCNA-397 (Xho I) 5'-TAT ATA CTC GAG GCT GTA CTC TCT TCA GGC-3'

3'PCNA-397 (Xho I) 5'-TAT ATA CTC GAG GCG ACG ACC GGC TGA GAC-3'

Mutageneseprimer:

5'PCNA-249-CRE/PM 5'-GGA CAG CGT GGT GAA TTC GCA ACG CGG CGC-3'

3'PCNA-249-CRE/PM 5'-GCG CCG CGT TGC GAA TTC ACC ACG CTG TCC-3'

5'PCNA-249-ΔCRE 5'-GGA CAG CGT GGTGCA ACG CGG CGC-3'

3'PCNA-249-ΔCRE 5'-GCG CCG CGT TGC ACC ACG CTG TCC-3'

Sequenzierprimer:

pGL3-RV3 5'-CTAGCAAAATAGGCTGTCC-3'

2.6 Bakterienstämme und Zelllinien

E.-coli K12 DH5 α (Gibco, Eggenstein)

Genotyp: [supE44, Δ lacU169 (Φ 80lacZ M15) hsdR 17 rec A1 endA1 gyrA96, thi1 relA1]

Dieser rekombinationsdefekte Bakterienstamm wurde zur Vermehrung von Derivaten der pBR322-Plasmide verwendet.

E.-coli K12 BL21 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Genotyp: [F⁻, ompT, hsdS (r_B⁻, m_B⁻), gal]

Es handelt sich um einen Protease-defizienten Bakterienstamm zur Expression von Fusionsproteinen.

KB-Zellen: American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA (Eagle, 1955)

Humane epidermale Rachen-Karzinomzelllinie

SW-13-Zellen: American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA (Leibovitz *et al.*, 1973), Humane Kleinzell-Karzinomzelllinie der Nebennierenrinde

C33A-Zellen: American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA (Gey *et al.*, 1952)

Humane epitheloide Cervix-Karzinomzelllinie

K562-Zellen: American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA

Humane erythromyeloide Leukämie-Zelllinie

2.7 Verwendete Vektoren

2.7.1 Reporterplasmide

pGL3-Basic basaler Luciferase-Reporter-gen-Vektor, Promega, Madison, USA

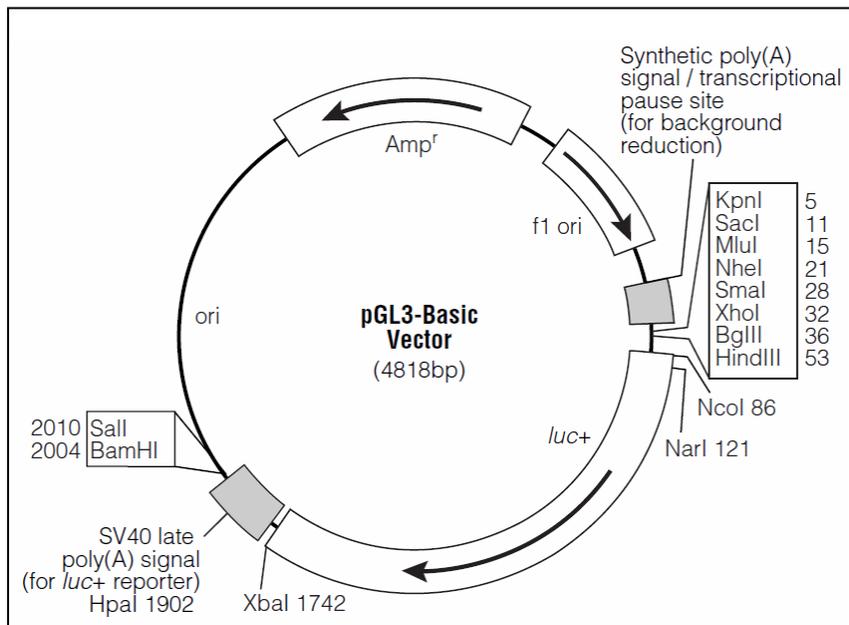


Abb. 7: pGL3 Luciferase Basic-Vektorkarte
(Quelle: Technical Manual No. 033, Promega, Madison, USA)

2.7.2 Expressionsplasmide

pcDNA 3.1-myc/his eukaryontischer Expressionsvektor, der die klonierten cDNAs als Fusionsproteine mit einem Myc-Epitop und einem C-terminalen Polyhistidin exprimiert (Invitrogen, Karlsruhe)

pBJ5-hBRG1 zur Verfügung gestellt von C. Muchhardt, Unité des Virus Oncogènes, Dpt. des Biotechnologies, Institut Pasteur, Paris, Frankreich

pCG-hBRM zur Verfügung gestellt von C. Muchhardt, Unité des Virus Oncogènes, Dpt. des Biotechnologies, Institut Pasteur, Paris, Frankreich

PCNA (-1265/+62)-CAT	enthält den humanen PCNA- Promotor von nt -1265 bis + 62, zur Verfügung gestellt von Michael B. Mathews, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA
pCMV-HA-HDAC1	zur Verfügung gestellt von A. Harel-Bellan, Laboratoire Oncogénèse, Différenciation et Transduction du Signal, Villejuif, Frankreich
pRc/CMV-A-CREB	kodiert für den dominant-negativen Inhibitor A-CREB; zur Verfügung gestellt von C. Vinson, Laboratory of Biochemistry, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
pRc/RSV	eukaryontischer Expressionsvektor, Invitrogen, Karlsruhe
pRc/RSV-E1A_{12S}	eukaryontischer Expressionsvektor, im eigenen Labor synthetisiert, exprimiert das E1A _{12S} - Protein von Ad12

2.8 Enzyme

Alkalische Phosphatase (1U/μl)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Lysozym (23000 U/μl)	Biomol, Hamburg
Restriktionsendonukleasen (2-50 U/μl)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim; und Promega, Heidelberg
T4-DNA-Ligase H.C. (5 U/μl)	Invitrogen, Niederlande
Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl)	Sigma, Deisenhofen
Trypsin (Rinderpankreas, 110 U/mg)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

2.9 Antikörper

Anti-hBRG1-AK (N- 19) (polyklonaler Kaninchen AK)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-hBRG1-AK (H-88) (polyklonaler Ziege AK)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Kaninchen IgG AK, Peroxidase-konjugiert	Pierce, Rockford, USA
Anti-Maus IgG AK, Peroxidase-konjugiert	Pierce, Rockford, USA
Anti-Ziege IgG AK, Peroxidase-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-myc-Epitop (9E10) AK (monoklonaler Maus IgG AK)	Invitrogen, Karlsruhe

2.10 Kultivierungsmedien

2.10.1 Medium und Zusätze für die Säugerzellen- Kultivierung

Medium:

DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium)	Life Technologies, Eggenstein
---	-------------------------------

Medien-Zusätze:

FKS (Fetales Kälber-Serum)	Life Technologies, Eggenstein
100 x NEAA	Life Technologies, Eggenstein
L-Glutamin	Merck, Darmstadt
Penicillin G (1000 U/ml)	Hoechst, Frankfurt
Streptomycinsulfat	Sigma, Deisenhofen

2.10.2 Medien für die E.-coli Kultivierung

Medium	Zusammensetzung
2x YT-Medium	16 g Bacto Tryptone 10 g Bacto Yeast Extract 5 g NaCl ad 1000 ml mit Aqua dest.
LB-Medium	10g Bacto Tryptone 5g Bacto Yeast Extract 10 g NaCl ad 1000 ml mit Aqua dest.
LB-Festagar:	20 g Bacto Agar 5 g Bacto Yeast Extract 10 g Bacto Tryptone 10 g NaCl

Tab. 4: Medien für die E.-coli Kultivierung

Die Medien wurden jeweils mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Bacto-Tryptone, Bacto Yeast Extract und Bacto-Agar wurden von Difco, Detroit, USA bezogen. Da bei der Kultivierung ein Selektionsdruck erzeugt werden sollte, wurde dem Nährmedium nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 55 °C das Antibiotikum Ampicillin (Binotal®) in der Endkonzentration 100 µg/ml zugesetzt. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C.

2.11 Kits und spezielle Reagenzien

Aprotinin (Rinderlunge, 4TIU/mg)	Sigma, Deisenhofen
BioRad Bradford-Reagenz, Transfectin	Bio-Rad, München
(Mini) Plasmid DNA Purification Kit NucleoBond® PC 20	Machery & Nagel, Düren
Plasmid-DNA-Minipräparations-Kit NucleoBond® AX 20	Machery & Nagel, Düren
Plasmid-DNA-Maxipräparations-Kit NucleoBond® AX 500	Machery & Nagel, Düren
OPTI-MEM	Life Technologies, Eggenstein
QIAamp® DNA Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit, Katalognr. 28106	QIAGEN GmbH, Hilden

QIAquick® Gel Extraction Kit, Katalognr. 28706	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAGEN ®Plasmid Maxi Kit, Katalognr. 12165	QIAGEN GmbH, Hilden
QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
PCR Mycoplasma Detection Set	Takara Shuzo, USA
pGem® T Easy Vector Systems	Promega, Madison, USA
Super-Signal-Ultra-Chemilumineszenz	Pierce, Rockford, USA
Detektionssystem (für Western Blot)	Perbio, Helsingborg, Schweden

Tab. 5: Kits und spezielle Reagenzien

2.12 Molekulargewichtstandards

1 kb plus Marker	Invitrogen, Karlsruhe
SDS-PAGE Standards (gefärbt)	BioRad, München

2.13 Filme, Filter, Membranen und besondere Verbrauchsmaterialien

Gluthation-Sepharose 4B	Amersham Biosciences Freiburg
Hybond-C-plus Nitrocellulose-Membran	Amersham Biosciences Freiburg
Röntgenfilme X-Omat AR	Kodak, Rochester, USA
Sterivex-GS 0,22 µm Filter Unit	Millipore, Bedford, USA
Whatman Filterpapier	Whatman, Maidstone, England

Tab. 6: Filme, Filter, Membranen und besondere Verbrauchsmaterialien

3. Methoden

Die Arbeiten mit humanen Tumorzellen wurden unter einer sterilen Werkbank (Typ VC 2.23.2 S Nr. 1, BSH AG, Bad Hersfeld, Baujahr 1975) ausgeführt. Bakterien, Proteine und Nucleinsäuren wurden, soweit nicht gesondert erwähnt, während sämtlicher Arbeitsschritte auf Eis gelagert. Lösungen und Materialien wurden durch Autoklavieren (121 °C, 1 bar Dampfdruck), oder durch Sterifiltration (hitzeempfindliche Komponenten) sterilisiert.

Aus Platzgründen sind nicht gesondert aufgeführte molekularbiologische Arbeitstechniken den Laborhandbüchern "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." (Sambrook *et al.*, 1989) und "Current Protocols in Molecular Biology." (Ausubel *et al.*, 1987) zu entnehmen.

3.1 Labortechnische Sicherheit

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden entsprechend dem Gentechnikgesetzes (1993) in einem Labor der Sicherheitsstufe S1 durchgeführt. Die Aufbewahrung sowie Handhabung der Chemikalien entsprachen der Gefahrenstoffverordnung (1999).

Alle Säugerzellen-, Bakterien- und Nucleinsäure-haltigen Abfälle wurden vor der Entsorgung autoklaviert (121 °C; 1 bar Dampfdruck).

3.2 Zellbiologische Techniken

3.2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten mit humanen Tumorzelllinien wurden in einem separaten Zellkultur-Labor unter einer sterilen Werkbank (Typ VC 2.23.2 S Nr.1, BSH AG, Bad Hersfeld) durchgeführt. Sämtliche benötigten Medien, Puffer und Lösungen wurden sterifiltriert und anschliessend gekühlt gelagert. Für alle routinemässigen Zellkulturarbeiten wurden die verwendeten Lösungen im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt.

Als Nährmedium diente DMEM, dem auf 500 ml ergänzend 10 % fötales Kälberserum (FKS), 1,5 % NEAA, 1,5 % einer 2mM L-Glutamin-Lösung, und jeweils 100 µg/ml der Antibiotika Penicillin resp. Streptomycin zugegeben wurden (in der Folge als DMEM-Vollmedium bezeichnet).

3.2.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Die etablierten Zelllinien wuchsen adhärent in beschichteten Zellkulturflaschen (75 cm² bzw. 25 cm² Kultivierungsfläche) oder Zellkulturschalen (10er Platte mit 75 cm² bzw. 15er Platte mit 2,5 x 75 cm² Kultivierungsfläche) im Brutschrank bei 37 °C; 5% CO₂; und nahezu 100 % Luftfeuchtigkeit. Entsprechend ihrer Konfluenz (Wachstumsdichte) wurden die Zellen alle zwei bis vier Tage passagiert. Konfluent (80 - 90 %) gewachsene Zellen wurden einmal mit PBS= gewaschen, und mittels 0,25 %iger Trypsinlösung (VT) vom Boden des beschichteten Zellkulturgefäßes gelöst. Die abgelösten Zellen wurden in DMEM-Vollmedium resuspendiert, und im Verhältnis 1:5 bis 1:20 in neue Zellkulturgefäße mit DMEM-Vollmedium überführt.

3.2.1.2 Kryokonservierung und Reaktivierung von Zellen

Zum Anlegen von Zellstocks wurden nicht konfluent (50%) gewachsene Zellen wie oben beschrieben passagiert und anschliessend in 10 ml DMEM-Vollmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde abzentrifugiert (3 min; 300 xg; RT), das Zellpellet wurde in 2 ml Einfriermedium (DMEM-Vollmedium mit 20 % FKS und 10 % DMSO) resuspendiert, und als 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen überführt. Die Kryogefäße wurden mit Zellstoff isoliert und zunächst bei -80 °C schonend eingefroren, um dann nach 24 Stunden zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt zu werden.

Zum Auftauen wurden die Zellen rasch im Wasserbad (Typ 1013, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) erwärmt und anschliessend in 37 °C warmes, zusätzlich mit 5 % Serum versetztes, Vollmedium suspendiert.

3.2.1.3 Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer

In den Versuchen wurden definierte Zellzahlen eingesetzt. Für die Bestimmung der Zellkonzentration stand die Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim) zur Verfügung. Die zu bestimmende Zellsuspension wurde in den dafür vorgesehenen Bereich am Rande des Deckglases pipettiert. Die Zellen in allen vier Kammerquadranten wurden bei 100- bis 160-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop (Leitz Labovert, Leica Microsystems AG, Wetzlar) gezählt. Der Mittelwert dieser Zählung wurde mit dem Kammerfaktor (104) multipliziert.

3.2.1.4 Mycoplasmentest

Mycoplasmen stellen als prokaryontische Mikroorganismen ohne Zellwand eine der häufigsten Kontaminationen von Zellkulturen dar. Mycoplasmen beeinflussen Morphologie, Metabolismus und Proliferation von Zellen und damit die Ergebnisse von Experimenten. Zum Nachweis wurde Mycoplasmen-DNA aus Zellkultur-Überstand mit Hilfe des PCR Mycoplasma Detection Set, Takara Shuzo Co., Ltd. nach den Angaben des Herstellers amplifiziert und mittels Gel-Elektrophorese nachgewiesen. Kontaminierte Zellen wurden für drei bis vier Wochen mit den Antibiotika-Kombinationen BM-Cyclin 1 und BM-Cyclin 2 der Firma Roche (Cat. No. 799050) behandelt.

3.2.2 Transfektion eukaryontischer Zellen

Die Transfektion eukaryontischer Zellen erfolgte unter Verwendung liposomaler Transfektionsreagenzien, oder durch Elektroporation. Die eingesetzte DNA wurde zuvor mittels „Qiagen Plasmid Maxi Kit“ aufgereinigt und in *A. bidest* aufgenommen. Falls nicht anders erwähnt, wurde die Konzentration anschliessend auf 0,5 µg/µl eingestellt. Ziel der Transfektion ist es, Plasmid-DNA in die Zellkerne der KB-Zellen einzuschleusen, und so die Gen-Expression des Plasmids zu ermöglichen.

3.2.2.1 Lipofektion

Die Lipofektion erfolgte nach der Lipofektamin-Methode (Felgner und Ringold, 1989) mit TransFectin™ Lipid Reagent nach den Angaben des Herstellers Biorad. Hierbei bilden sich durch polykationische Lipide in wässriger Phase Komplexe aus Nukleinsäuren an Liposomen aus. Diese sind in der Lage, die Zellemembran endozytotisch zu passieren.

Eine definierte Menge der zu transformierenden Zellen ($1,5 - 2,5 \times 10^5$) wurden 18 bis 24 Stunden vor Transfektionsbeginn in 6-Loch-Zellkulturplatten (7 cm² Wachstumsfläche) in 2 ml DMEM-Vollmedium ausgesät und bebrütet. Im Idealfall sollten die Zellkulturen vor der Transfektion etwa 60 - 80 % Konfluenz erreicht haben.

Zunächst wurde ein Master-Mix mit 100 µl Transfektionsmedium und 7 µl TransFectin™ Lipid Reagent (gut gevortext) pro geplantem Ansatz hergestellt und auf nummerierte Polystyrol-Röhrchen (5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, N. J., USA) verteilt. Dann wurden 2 µg Gesamt-DNA pro Ansatz in 100 µl Transfektionsmedium aufgenommen, ebenfalls auf die nummerierten Reagenzgläser verteilt, und vorsichtig gemischt. Diese Mischung wurde bei RT für 20 Minuten zur Liposomen-Komplex-Bildung inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde das alte Medium von den Zellen abgenommen und durch je 0,5 ml Vollmedium ersetzt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Mischung auf die Zellen getropft und gleichmäßig verteilt, um anschließend für 5 Stunden im Brutschrank zu inkubieren. Nach dieser Zeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,3 ml Vollmedium gestoppt. Die Platten wurden dann über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bis am nächsten Morgen ein Mediumwechsel stattfand, und die Zellen nach 24 bis 48 Stunden geerntet werden konnten.

3.2.2.2 Elektroporation

Um eine erhöhte Transfektionseffizienz zu erzielen, wurden KB Zellen nach einer modifizierten Methode nach Melkonyan *et al.* elektroporiert. Diese Methode nutzt den Effekt, dass elektrische Impulse die Durchlässigkeit von Biomembranen erhöhen, ohne die Membranstruktur nachhaltig zu schädigen. Durch vorübergehend gebildete „Löcher“ können Partikel wie DNA in das Cytoplasma gelangen. Die benötigte Feldstärke richtet sich dabei nach der jeweiligen Zelllinie und kann mit der folgenden Formel berechnet werden:

$$EC = \frac{VC}{1,5xa}$$

[a: Zellradius (cm), EC: Kritische Feldstärke (V/cm), VC: Kritische Durchbruchspannung bei RT = 1 V; VC (4 °C) = 2 V]

Unter Berücksichtigung des Elektrodenabstandes der verwendeten Küvette (hier 4 mm) lässt sich aus der ermittelten Feldstärke die am Elektroporator einzugebende Spannung berechnen:

$$V = EC \times d$$

[d: Elektrodenabstand (cm)]

Bei dem errechneten Wert handelt es sich um einen Richtwert. In einer individuellen Testreihe wurden die optimalen Bedingungen für KB-Zellen bei einem Wert von 200 V ermittelt.

Die Zellen für die Transfektion wurden auf 15er Platten kultiviert, wie für eine Zellpassage gewaschen, trypsinisiert, und in DMEM-Vollmedium aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension für 5 min bei 2500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet in einem berechneten Volumen DMEM-Vollmedium + 10 % FKS gelöst, so dass jeder 700 µl Ansatz 5 x 10⁶ Zellen enthielt.

In einem Eppendorf-Tube wurde die zu transfizierende DNA mit der Zellsuspension vermischt, blasenfrei in eine 4 mm Elektroporationsküvette überführt, und für 1 min bei RT inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen bei folgender Geräteeinstellung (Electro Square Porator ECM 830, BTX, San Diego, USA) elektroporiert: unipolarer LV-Mode, Intervalldauer 1,0 s; 2 Pulse bei 99 msec Pulslänge und 200 V Spannung.

Nach zwei- bis dreiminütiger Inkubationszeit bei RT wurden die transfizierten Zellen in DMEM-Vollmedium auf 10 cm Durchmesser-Zellkulturschalen gespült, und im CO₂-Inkubator kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die transformierten Zellen auf neue Kulturschalen umgesetzt, und nach weiteren 24 Stunden geerntet.

3.2.3 Reporteragen-Assays

Reporteragen-Assays können zur Messung der Aktivität von Transkriptionsfaktoren eingesetzt werden. Dabei wird die Expression von so genannten Reporteragen gemessen, welche von Promotoren mit Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor angetrieben werden. Dabei ist die Transkriptionsrate des Reporters umso höher, je aktiver der Transkriptionsfaktor ist.

3.2.3.1 Luciferase-Assays

Die Glühwürmchen-Luciferase ist ein sehr sensitives Reporteragen. Dieses monomere 61-kDA-Protein katalysiert die ATP-abhängige oxidative Decarboxylierung von Luciferin unter Emission von Licht:

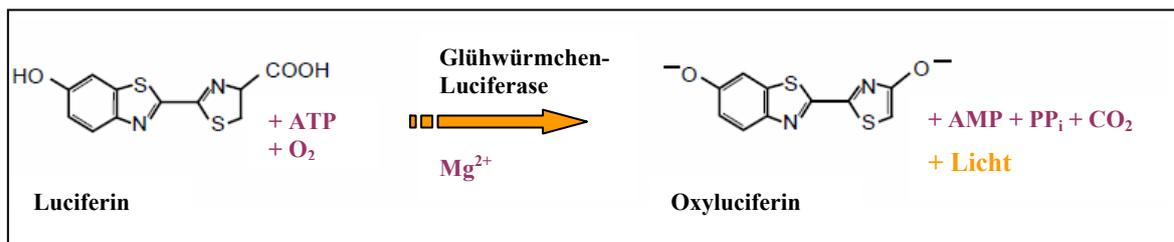


Abb. 8: Oxidative Decarboxylierung von Luciferin unter Emission von Licht. (PP_i) Diphosphat (Quelle: Technical Bulletin No. 281, Promega, Madison, USA)

Unter Substratsättigung ist die Enzymaktivität proportional zur gebildeten Enzymmenge, und somit zur Aktivität des Transkriptionsfaktors. Die für Luciferase kodierende cDNA (*luc*) wurde erstmals 1985 von dem nordamerikanischen Glühwürmchen *Photinus pyralis* kloniert.

Der Luciferase-Assay wurde mit dem Luciferase Assay System und dem pGL3 Luciferase Reporter Vector (s. 2. 7. 1), beide Promega, Madison, USA, durchgeführt.

Lösung	Zusammensetzung
1 x Luciferase-Lysepuffer	25 mM Tris-Phosphat (pH 7.8); 2 mM DTT; 2 mM 1,2-Diaminocyclohexane-N, N, N', N'- Tetraessigsäure; 10 % Glycerol; 1 % Triton-X-100
Luciferase Assay Reagenz	20 mM Tricin; 1,07 mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$; 2,67 mM MgSO_4 ; 0,1 mM EDTA; 33,3 mM DTT; 270 μM CoA; 470 μM Luciferin; 530 μM ATP; pH 7,8; aliquotiert à 1ml; <i>dunkel</i> bei -80°C gelagert

Tab. 7: Lösungen für den Luciferase-Assay

Die in six-wells transfizierten Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS= gewaschen. Es folgte die Zelllyse durch fünf- bis zehnminütige Inkubation in je 70 μl 1 x Lysispuffer (der 5-fach konzentriert gelieferte Lysispuffer wurde zuvor 1:5 verdünnt), darauffolgendem Abschaben mit dem Gummischaber, sowie durch sich anschließendes kurzes und kräftiges Vortexen. Das Lysat wurde für 5 min bei 12000 rpm und 4°C abzentrifugiert, dann wurde aus dem klaren Überstand die Proteinbestimmung nach Bradford mit dem Lysispuffer als Referenzwert durchgeführt.

Vor der Messung wurde 1 ml Luciferase Assay Reagens aufgetaut und, mit Alufolie vor Lichteinfall geschützt, für kurze Zeit bei RT gehalten. Die Proteinproben wurden ebenfalls bei RT zur Luciferase-Messung eingesetzt. Auf Handschuhe im Umgang mit den Teströhrchen wurde wegen möglicher Verfälschung der Meßwerte verzichtet. Testreihen hatten deutlich erhöhte Hintergrund-Lichtintensitäten bei den zuvor gebrauchten Latex-Handschuhen ergeben. Als ursächlich hierfür könnten Lichtemissionen nach statischer Aufladung in Betracht gezogen werden.

Vor der Messung wurde das Luciferase Assay Reagenz in das Schlauchsystem (Fassungsvermögen: 600 μl) des Luminometers gepumpt.

Von jeder Probe wurden 1 - 4 μl in ein Polyesterol-Röhrchen (Sarstedt) vorgelegt, und umgehend in den Meßschacht des Luminometers (Lumat LB 9501, Berthold Technologies, Bad Wildbad) gestellt. Sodann folgte die automatische Injektion von 100 μl Substratlösung.

Das Gerät (Betriebsart: RAW DATA) wurde von mir wie folgt eingestellt:

Geräteparameter:

Measuring Time	20.0 s
No. of Inj. per Measurement	1
Delay 1st/ 2nd Inj.	0.0 s
Delay last Inj. / Meas.	0.0 s
Injection Time	1.2 s
Cal. Factor for RLU	0.998
Max. PMT-BKG	50 (RLU/s)
Back-Pressing Inj.1	3.0 ms
Back-Pressing Inj.2	-8.0 ms

Der Messwert wird in RLU (engl.: relative light units) angegeben.

Jedes Experiment wurde in Duplikaten durchgeführt, von denen jeweils der Gerätehintergrund abgezogen, und der Mittelwert gebildet wurde.

3.3 Molekularbiologische Techniken

3.3.1 Bakterienkultur

3.3.1.1 Kultivierung und Lagerung von Escherichia coli (E.- coli)

Der gewünschte Bakterienstamm wurde von einer Einzelkolonie auf einer Agarplatte, oder direkt aus der Glycerinkultur, in sterilem LB-Medium, welches mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt wurde, angeimpft, und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Alle hier verwendeten Plasmide tragen ein Ampicillin-Resistenzgen. Zur Herstellung von Glycerinkulturen wurden 1 ml der Übernachtskultur bei 4000 rpm abzentrifugiert, und in 500 µl LB-Medium mit 50 % Glycerol resuspendiert. Die Glycerinkulturen wurden bei -80 °C gelagert.

3.3.1.2 Präparation kompetenter E.-coli Bakterien

Die Herstellung kompetenter Bakterien des E.-coli Stammes DH5α wurde nach einer modifizierten Methode nach Hanahan (1983) durchgeführt.

Lösung	Zusammensetzung
TFB1	100 mM RbCl; 50 mM MnCl ₂ ; 30 mM Kaliumazetat pH 5,8; 10 mM CaCl ₂ ; 15 % Glycerin, steril filtrieren
TFB2	10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl ₂ ; 15 % Glycerin; pH 6,8 mit KOH einstellen, steril filtrieren

Tab. 8: Transferpuffer für die Präparation kompetenter E.-coli Bakterien

100 ml einer frischen Übernachtskultur des E.-coli-Stammes DH5 α wurde bis zu einer OD 600 nm von max. 0,4 im Schüttelinkubator bei 37 °C und 200 rpm vermehrt.

Die Bakterien wurden 10 Minuten auf Eis abgekühlt und anschließend abzentrifugiert (4000 rpm, 4 °C, 5 min). Es folgte die Resuspension des Bakterienpellets in 40ml TFB-1, eine zehnmütige Inkubation auf Eis, sowie erneute Zentrifugation (4000 rpm; 4 °C; 5 min). Das Pellet wurde in 4 ml eiskaltem TFB-2 resuspendiert, und 60 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Lagerung wurden die kompetenten Bakterien zu je 100 μ l aliquotiert, im Trockeneisbad schockgefroren, und anschließend bei -80 °C aufgehoben.

3.3.1.3 Transformation kompetenter E.-coli Bakterien

Zur Transformation wurden 100 μ l kompetente E.-coli auf Eis aufgetaut, sofort mit 10 - 50 ng Plamid-DNA durch kurzes, vorsichtiges Rühren vereinigt, und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der anschließende, genau 90 Sekunden dauernde Hitzeschock bei 42 °C erleichterte die Plasmid-DNA-Aufnahme. Der Reaktionsansatz wurde sofort wieder auf Eis gestellt, und dort für weitere 3 min belassen.

Der fertige Transformationsansatz wurde auf Agarplatten (100 μ g/ml Ampicillin) zur Selektion transformierter Bakterien ausplattiert. Diese Platten wurden für max. 20 Stunden (cave: bei längerer Inkubation frequente Ausbildung von Satelliten-Kolonien) im Brutschrank inkubiert. Von ausgewählten Bakterienklonen wurden Bakterienstocks angelegt, wozu 500 μ l einer Übernachtskultur mit 500 μ l Glycerin gemischt, und bei -80 °C gelagert wurden.

3.3.2 Isolierung und Charakterisierung von Plasmid-DNA

3.3.2.1 Mini- und Maxi- Präparationen

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus E.-coli im quantitativen Maßstab kamen die beiden kommerziell verfügbaren Systeme „Quiagen®Plasmid Maxi Kit“ der Firma Quiagen, und „Nucleobond® PC20 (Mini) Plasmid DNA Purification“ der Firma Macherey & Nagel zum Einsatz. Für die Herstellung großer DNA-Mengen mit hohem Reinheitsgrad (wichtig z. B. für die Anwendungen in der Zellkultur) wurde das Maxi-Kit von Quiagen eingesetzt (Ausgangsmenge 200ml Übernachtskultur in LB-Medium), zur Analyse von Einzelkolonien, die nach Transformation eines Ligationsansatzes auf Agarplatten gewachsen waren, wurde das Mini-Kit von Macherey & Nagel eingesetzt (Ausgangsmenge 1,5 ml einer 5-Stunden-Kultur in LB-Medium). Die Plasmid-Präparation beruht in beiden Fällen auf einer optimierten Form der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly, 1979. Die Zellen werden durch alkalische Lyse aufgeschlossen und denaturiert, im Anschluß wird die Plasmid-DNA durch Anionenaustauscher-Säulen unterschiedlicher Größe gereinigt. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers mit den im Kit enthaltenen Lösungen. Die im Eluat befindliche Plasmid-DNA wurde durch Fällung mit Isopropanol (vgl. 2.) konzentriert, und anschließend mit Ethanol gewaschen. Schließlich wurde das DNA-Pellet 10 bis 20 Minuten im Exsikkator getrocknet, und je nach Größe in 20 µl (Mini) bis 150 µl (Maxi) Aqua dest. aufgenommen. Die Sequenzierung aller innerhalb dieser Arbeit hergestellten DNA-Konstrukte wurde, nach Einstellung auf 150 ng/µl in 60 µl wässriger Lösung, von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt.

3.3.2.2 DNA-Quantifizierungen

Um in den weiteren Schritten definierte Mengen von DNA einsetzen zu können, wurden die Proben auf DNA-Gehalt und Reinheit untersucht. DNA-Lösungen weisen bei einer Wellenlänge von 260 nm eine spektralphotometrisch nachweisbare Extinktion (A) auf, die nach dem Lambert-Beerschen Gesetz der Konzentration proportional ist. Gemessen wurde gegen Aqua dest. als Referenzwert in einer Quarz-Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm. Einer Optischen Dichte (OD) von 1 entspricht dabei eine Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (dsDNA). Die zu messende Lösung wurde so verdünnt, dass im linearen Bereich zwischen $A = 0,1$ und $A = 1,0$ gemessen werden konnte. Zusätzlich wurde auch die Extinktion bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) bestimmt. Der Quotient $A(260 \text{ nm}) / A(280 \text{ nm})$ gibt Informationen zu möglichen Proteinkontaminationen, und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.3.3 Modifikation von DNA-Sequenzen

3.3.3.1 Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Endonukleasen schneiden DNA an einer für das jeweilige Enzym spezifischen Sequenz. Die Behandlung von PCR-Fragmenten oder Plasmiden mit Restriktionsenzymen erfolgte nach Herstellerangaben im empfohlenen Reaktionspuffer und der für das Enzym optimalen Temperatur (i. d. R. 37 °C), sowie BSA nach Bedarf. Der Prozess diente der Vorbereitung von Insert und Vektor für Ligationsreaktionen. Für die Restriktion von Plasmid-DNA wurden 1 - 2 U Enzym pro µg DNA eingesetzt, und für mindestens 2 Stunden in einem Endvolumen von 30 µl inkubiert. Wenn möglich, wurde ein Doppelverdau, bei mangelhafter Übereinstimmung der Pufferbedingungen zunächst eine Fällung der einmal geschnittenen DNA, vor Ansatz des zweiten Verdaus durchgeführt. Anschliessend wurde die Effizienz der Spaltung auf einem Agarosegel dokumentiert.

3.3.3.2 Dephosphorylierung von 5'-Phosphatenden

Vor der Ligation wurden linearisierte Klonierungsvektoren mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm, „Calf Intestine Alkaline Phosphatase“ (CIAP) dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu verhindern. Zu diesem Zweck katalysiert Alkalische Phosphatase die Dephosphorylierung des 5'-Phosphates von DNA, welches die DNA-Ligase für die Ligation benötigt. So soll erreicht werden, dass nur die PCR-Fragmente eingebaut werden, deren Enden die Phosphatgruppen noch tragen. Nach dem Restriktionsverdau wurde 1/10 Volumen 10 x CIAP-Puffer, und 1U CIAP-Enzym zugegeben, und nach den Herstellerangaben inkubiert (Boehringer, Ingelheim). Anschliessend wurde die DNA über ein Agarosegel von den Enzymen und den herausgespaltenen Fragmenten gereinigt, und abgetrennt.

3.3.3.3 Native Agarosegele

Die horizontale Agarosegel-Elektrophorese dient der Kontrolle von PCR-Produkten, Plasmiden, und Restriktionsverdauen. So kann eine Größenbestimmung und Konzentrationsabschätzung von DNA-Fragmenten durchgeführt werden. Der halb feste, wasserunlösliche Kolloidanteil im Gel bildet eine Art molekulares Sieb, dessen Porengrösse von der Agarosekonzentration im Gel abhängt. So können DNA-Fragmente zwischen 200 bp und 25 kbp Länge elektrophoretisch aufgetrennt werden. 0,8 - 2 % Agarose wurden in 1 x TAE-Puffer (50ml) suspendiert, und durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 50 °C wird die Suspension mit 0,1 - 0,5 µg/ml Ethidiumbromid, einem Fluoreszenzfarbstoff der zwischen die Basenpaare

interkaliert, versetzt, damit die DNA-Banden später im UV-Licht sichtbar gemacht werden können. Daraus wird mit Hilfe eines Gelschlittens und eines Kammes ein Gel mit Taschen gegossen (s. Abb. 9). Das erstarrte Gel wird in eine Elektrophoresekammer gegeben, und knapp mit TAE-Puffer überschichtet. Den zu analysierenden DNA-Lösungen wurde 1/5 des Endvolumens 5 x Probenpuffer zugefügt, außerdem wird ein DNA-Größenmarker (Invitrogen, Karlsruhe) aufgetragen. Das Gel wird auf einen alkalische pH-Wert ($\sim 8,5$) eingestellt, und eine Spannung von 2 - 5 V/cm² für 30 bis 60 Minuten bei RT angelegt. Da Nukleinsäuren im alkalischen pH-Bereich als Polyanionen vorliegen, wandern die DNA-Fragmente zur Anode. Dabei ist die zurückgelegte Laufstrecke umgekehrt proportional zum Logarithmus der Größe der DNA-Fragmente, die dann auf einem UV-Transilluminator analysiert, und fotografiert werden können.

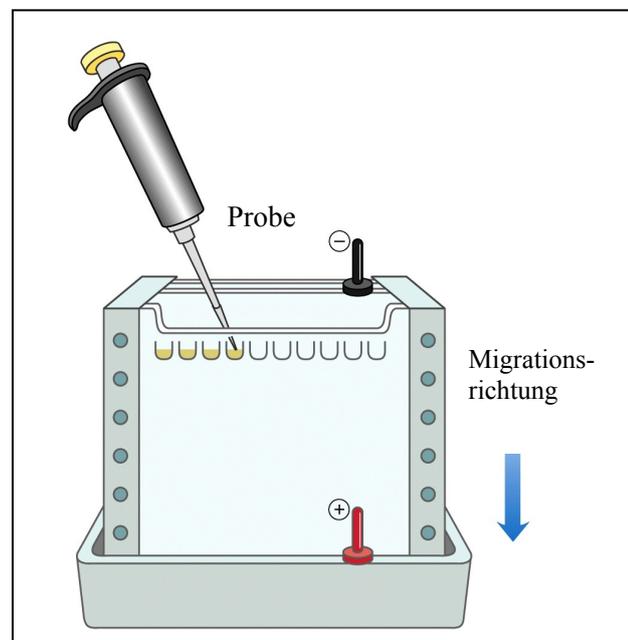


Abb. 9: Prinzip der Gelelektrophorese. Die zu analysierenden Proben werden in die Taschen des Polyacrylamidgels gefüllt. Wird ein elektrisches Feld angelegt, wandern die Proben in das Gel. Durch das Gel können durch Temperaturgradienten verursachte Konvektionsströmungen, sowie Proteinbewegungen, die durch andere Faktoren, als das elektrische Feld verursacht werden, minimiert werden.

3.3.3.4 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Unter UV-Licht wurden die gewünschten Banden mit einem Skalpell herausgeschnitten. Hierbei wurde auf eine kurze Belichtungszeit (Vermeidung von UV-Schäden), sowie auf die Aussparung größerer Agarose-Reste geachtet. Die Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte sodann mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von Quiagen nach den Angaben des Herstellers. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der Bindung von DNA an Silicagel-Membranen in Zentrifugations-säulchen, nachdem die Agarose geschmolzen wurde. Die Bindung an Silicagel-Matrizen erfolgt

unter Hochsalzbedingungen. Im letzten Schritt wurde die DNA mit 30 µl Aqua dest. eluiert, und ihre Konzentration photometrisch bestimmt.

3.3.3.5 Reinigung von PCR-Produkten

Zur Reinigung von PCR-Ansätzen mit dem Ziel der Isolierung des PCR-Produktes unter Abtrennung der Primer und Reaktionsbestandteile, wurde das kommerzielle System „PCR Purification Kit“ der Firma QIAGEN nach Angaben des Herstellers eingesetzt (s. 2. 11). Das gereinigte PCR-Produkt wurde i. d. R. im letzten Schritt des Protokolls mit 30 µl Aqua dest. von der Anionenaustauscher-Säule eluiert.

3.3.3.6 Ligation von DNA

Die T4-DNA-Ligase verknüpft unter ATP-Verbrauch die 3'-OH-Gruppe mit der 5'-Phosphatgruppe kovalent durch Ausbildung einer Phosphatdiesterbindung zur Ligation des Vektors mit dem Insert. Das molare Verhältnis von Vektor und Insert wurde zwischen 1:2 und 1:15 gewählt, je nach Qualität der Fragmente. Die zu ligierenden Fragmente wurden mit 1/5 des Endvolumens 5 x Puffer und 2,5 U T4-Ligase (Invitrogen, hc, 5 U/µl) in einem Endvolumen von 20 µl gemischt. Parallel wurde jeweils ein Kontroll-Versuch mit Religanden (nur Vektor, ohne Insert) durchgeführt. Der Ansatz wurde drei bis fünf Stunden bei RT inkubiert und anschließend transformiert.

3.3.4 Amplifikation von DNA-Sequenzen

3.3.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine in vitro-Technik zur selektiven Verervielfältigung von DNA-Abschnitten bestimmter Länge und definierter Sequenz. Sie wurde 1985 von Mullis und Mitarbeitern (Mullis *et al.*, 1986) entwickelt, und beruht auf der Fähigkeit von DNA-Polymerasen, DNA-Einzelstränge zu Doppelsträngen aufzupolymerisieren. Die PCR ist eine thermozyklische Reaktion, wobei in jedem Zyklus theoretisch die zu Zyklusbeginn bereitgestellte DNA-Menge verdoppelt wird. PCR-Thermocycler regeln in definierten Zeitabständen die gewünschten Temperaturen. Benötigt werden Primer (einzelsträngige Oligonukleotide), die komplementär zu den flankierenden Sequenzen der zu amplifizierenden DNA-Matrize (template) sind, und eine ausreichende Menge dNTPs, sowie DNA-Polymerase. Durch Einsatz der hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) wurde die Durchführung sämtlicher Reaktionszyklen im gleichen Reaktionsansatz ermöglicht, so dass die

Notwendigkeit, nach jedem Denaturierungsschritt wieder neue DNA-Polymerase hinzugeben zu müssen, entfällt. Zunächst wird die doppelsträngige DNA (dsDNA) bei 94 °C denaturiert (Aufbruch der Wasserstoffbrücken); es entsteht Einzelstrang-DNA (ssDNA). Nach Abkühlung des Ansatzes auf 60 °C können die beiden Oligonukleotide, die jeweils zum 3'-Ende des zu amplifizierenden Abschnittes komplementär sind (s. Abb. 10), an die ssDNA anlagern (Annealing). Das Hybridmolekül ist jetzt nur im Bereich der Primer doppelsträngig. Die Idealtemperatur für diesen Schritt kann mit Hilfe der Schmelztemperatur (T_m) der Primer, welche für diese Arbeit beide mit einer $T_m > 50$ °C ausgewählt wurden, abgeschätzt werden. Die Schmelztemperatur (T_m) des Primers bezeichnet die Temperatur, bei der 50 % der Primer nicht an die Template DNA gebunden sind. Eine grobe Formel zur Errechnung der Schmelztemperatur kurzer Primer ist die Wallace-Regel, aus welcher auch erkennbar wird, dass der T_m - Wert von Länge und Sequenz des Primers abhängt:

$$T_m = 2\text{ °C} \times (A + T) + 4\text{ °C} \times (C + G)$$

Zieht man von der Schmelztemperatur 5 - 10 °C ab, erhält man einen groben Anhaltspunkt für die Annealing-Temperatur. In einem 3. Schritt ergänzt die Polymerase die Einzelstränge, indem sie die dNTPs komplementär zur Matrize an die freien OH-Gruppen des Primers anhängt („Syntheserichtung" von 5' nach 3', Extension).

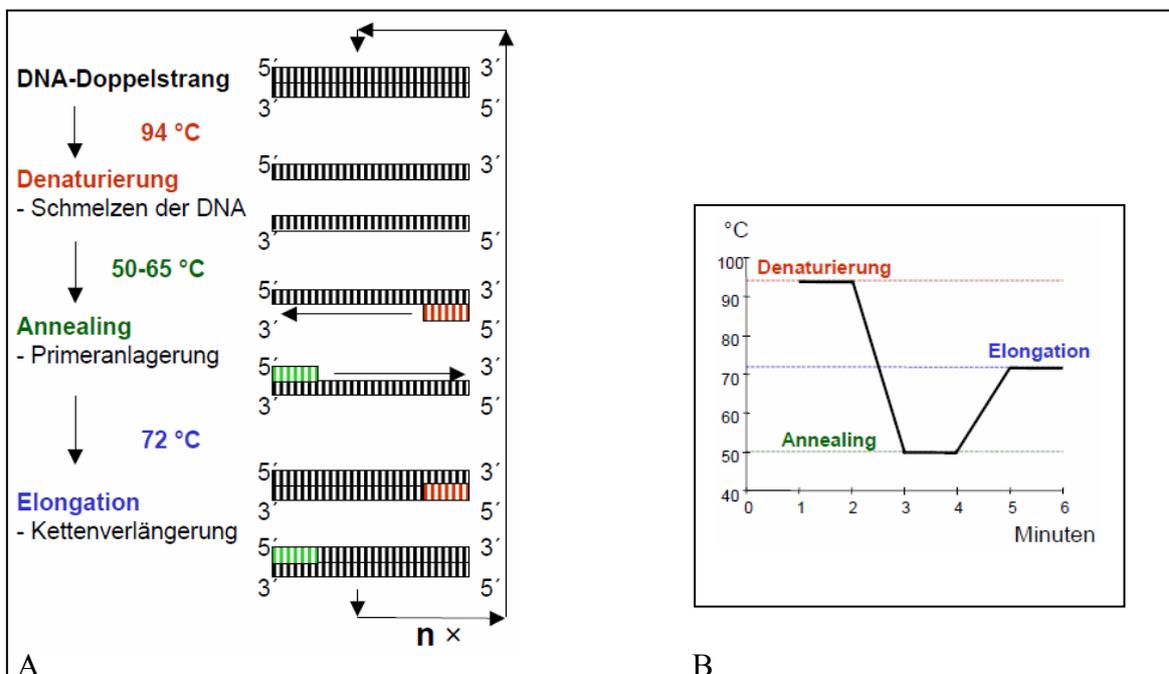


Abb. 10: Prinzip (A) und typisches Programm (B) der Polymerase Chain Reaction (PCR).

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt:

Schema für PCR-Reaktionen:

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

Der Reaktionsansatz wurde kurz abzentrifugiert und, bei Amplifikation im DNA Trio Thermoblock von Biometra, mit 2 Tropfen Mineralöl als Verdunstungsschutz überschichtet.

PCR-Bedingungen:

Erste Denaturierung	95 °C	5 Minuten	
Denaturierung	95 °C	30 Sekunden	} 30 Zyklen
Annealing	60 °C	1 Minute	
Elongation	72 °C	30 Sekunden	
Abschluß-Verlängerung	72 °C	5 Minuten	
Pause/Kühlung	4 °C	∞	

Zur Kontrolle wurden 25 μl der Probe zusammen mit 5 μl Ladepuffer auf ein 0,8 - 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Das Verfahren wurde zur Klonierung von DNA-Sequenzen, und zur Identifizierung Insert-positiver Bakterienklone nach einer ungerichteten Klonierung eingesetzt. Die Ansätze wurden bei 4 °C aufbewahrt, und im Anschluss i. d. R. mittels PCR-Reinigungs-Kit (vgl. 2. 11) aufgearbeitet.

3.3.4.2 Identifizierung Insert-positiver Bakterienklone mittels PCR-Screening

Das PCR-Screening ermöglicht eine Identifizierung Insert-positiver Klone mit korrekter Insert-Orientierung nach der hier durchgeführten ungerichteten Klonierung. Voraussetzung sind ein sowohl in der Vektorsequenz, als auch ein in der Insertsequenz bindender Primer. Zu einer Amplifikation der Insert-DNA kann es dabei nur kommen, wenn sich das Insert in der richtigen Orientierung in der Vektor-DNA befindet. Es wurden 10 Klone von einer Ampicillin-haltigen

Agarplatte isoliert, und in jeweils 15 µl Aqua dest. resuspendiert. Von diesen 15 µl wurden 10 µl mit den insertspezifischen Primern für die PCR eingesetzt. Die restlichen 5 µl wurden mit 500 µl LB-Amp Medium vier bis fünf Stunden bei 37 °C auf dem Schüttelinkubator kultiviert, um bei einem positiven Screening für eine Mini-Präparation eingesetzt zu werden. Die gelelektrophoretische Auftrennung des PCR-Ansatzes ermöglichte die Identifizierung positiver Klone und deren Insertgröße.

3.3.5 Mutagenese von DNA-Sequenzen

3.3.5.1 pGEM®-T Easy Vector Systems

Um die Funktionalität des Promotors zu überprüfen, wurde eine Zwischenklonierung in die kodierende Sequenz für das α -Peptid des β -Galaktosidase-Gens (*lacZ*) aus E.-coli auf dem Vektor pGEM®-T Easy von Promega durchgeführt. Zunächst wurde die gewünschte Promotor- Sequenz durch PCR amplifiziert, und aus Agarose-Gel aufgereinigt (vgl. 2. 11). Die Ligation erfolgte nach den Angaben des Herstellers durch Mischen von 5 µl 2x Rapid Ligation Buffer, 3 Weiss units T4 DNA-Ligase, sowie einem molaren Verhältnis 1:3 von Vektor zu Insert. Es wurde zu einem Endvolumen von 10 µl mit Aqua dest. aufgefüllt, und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Transformation des Ligationsansatzes in kompetente E.-coli Bakterien, welche anschließend auf LB/amp/IPTG/X-Gal-Platten ausplattiert wurden. Parallel wurde eine Positivkontrolle, ebenfalls nach Herstellerangaben, durchgeführt.

Nach 16 bis 24 Stunden Inkubation im Brutschrank konnte das Verhältnis von weißen zu blauen Kolonien, und damit der Klonierungserfolg abgeschätzt werden. β -Galaktosidase katalysiert die Hydrolyse von β -Galaktosiden, z. B. X-gal, und ruft so eine Blaufärbung hervor. Im Falle einer erfolgreichen Einklonierung des Inserts kommt es jedoch zu einer Unterbrechung der Sequenz für das α -Peptid des *lacZ*-Gens, was optisch als weiße Kolonie zu erkennen ist. Diese Klone können nun für einen PCR-Screen `gepickt` werden.

3.3.5.2 QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit

Die zielgerichtete (site-directed) Mutagenese ermöglicht den gezielten Austausch (Punktmutation), die gezielte Einführung (Insertion), oder die Entfernung (Deletion) von Aminosäuren. In dieser Arbeit wurde für die Punktmutation sowie für die Deletion im Bereich des CRE-Elementes des PCNA- Promotors das QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, USA) eingesetzt (s. Kap. 2. 11; 4. 2). Als Matrize für die Mutagenese-PCR diente ein doppelsträngiger Vektor (pGL3-Basic). Es mussten zwei, 24 und 30 bp lange, Primer synthetisiert werden, die

komplementär zueinander, und komplementär zu der zu mutierenden Stelle im Plasmid sind, und in ihrer Mitte die Mutation enthalten (vgl. Abb. 11). Ein entsprechendes Primerdesign (vgl. 2. 5) wurde mit der QuikChange® Primer-Design Software (vgl. 2. 4) erstellt, und von der Firma Metabion, Martinsried synthetisiert.

Diese Primer lagern sich während der PCR an das denaturierte Plasmid an, und der jeweils neu synthetisierte Strang enthält den Primer, und damit die Mutation (vgl. Abb. 11). Nach einigen Zyklen entstehen hauptsächlich Plasmide mit Mutationen in beiden Strängen.

Zur Entfernung nicht-mutierter Ursprungsplasmide aus der Probe wurde diese nach der Mutagenese-PCR mit der Restriktions-Endonuklease Dpn I verdaut. Dabei macht man sich die Tatsache zunutze, dass dieses Enzym methylierte DNA, und damit nur Plasmide, die von Bakterien gebildet wurden, nicht jedoch die durch die PCR synthetisierten, schneidet. Anschließend wurde die Probe in E.-coli transformiert (vgl. 3. 3. 1. 3).

Schema für Mutagenese-PCR:

50 ng Template DNA (ds), 5 µl 10 x Reaktionspuffer

1 µl dNTP mix, 125 ng Primer 1, 125 ng Primer 2

ad 50 µl Aqua dest.

1 µl Pfu-Turbo DNA-Polymerase (2,5 U/µl)

Die Pfu-Turbo-Polymerase wird zuletzt zugegeben, und besitzt aufgrund ihrer Exonuklease-Aktivität eine höhere Genauigkeit als die Taq-Polymerase.

PCR-Bedingungen:

Erste Denaturierung	95 °C	30 Sekunden
Denaturierung	95 °C	30 Sekunden
Annealing	55 °C	1 Minute
Elongation	68 °C	5 min (1 min/kb Plasmidlänge)

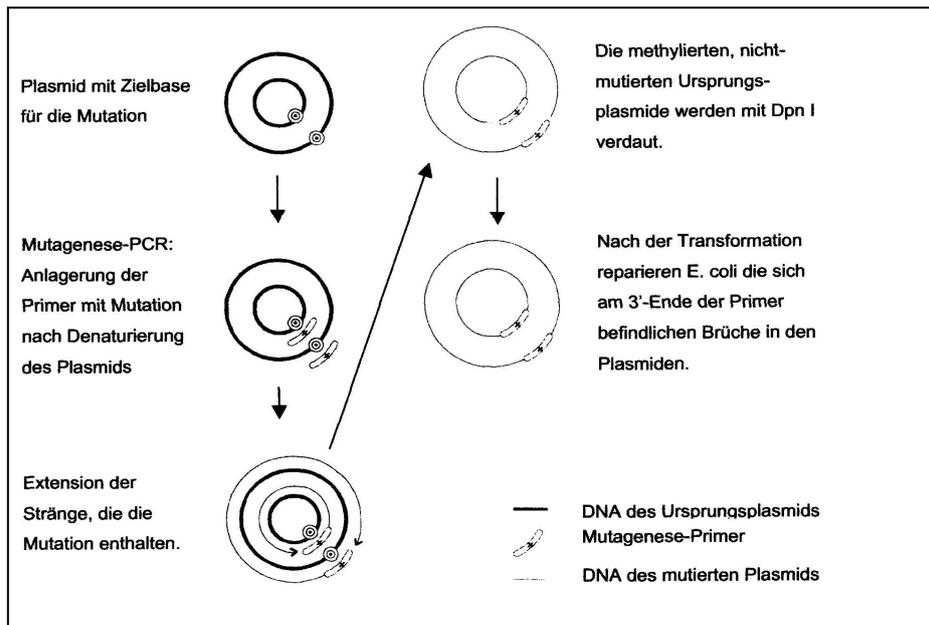


Abb. 11: Prinzip des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit.

(Quelle: Manual Quik Change® Site-directed Mutagenesis Kit, Stratagene, La Jolla, USA)

Für die Punktmutation wurden 12 PCR-Zyklen, für die Deletion 18 PCR-Zyklen mit dem T 3000 Thermocycler (Biometra) durchgeführt. Zur Kontrolle wurden 10 µl der Probe auf ein Agarosegel aufgetragen, und elektrophoretisch analysiert. Die restliche Probe wurde mit 1 µl Dpn I (10 U/µl) für 1 Stunde bei 37 °C verdaut. Anschließend wurden 1 - 5 µl des Ansatzes in E.-coli transformiert, und auf Agarplatten ausgestrichen. Am nächsten Tag wurden die gewachsenen Kolonien gepickt, und in 1,5 ml LB-Amp-Medium über Nacht kultiviert. Zuletzt wurden die Plasmide mit dem NucleoBond® PC 20 (Mini) Plasmid DNA Purification Kit (s. 2. 11) gereinigt, und die Konzentration auf 150 ng/µl zur Sequenzierung eingestellt.

3.4 Proteinbiochemische Techniken

3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Dieser Assay beruht auf der Methode nach Bradford, 1976, bei der Proteine durch Coomassie-Brilliant-Blau-Einlagerung colorimetrisch bei einer Wellenlänge von 590 nm nachgewiesen werden. Die Bestimmung der Proteinkonzentration in wässriger Lösung wurde mit dem „BioRad Bradford-Reagenz“ durchgeführt. Dafür wurden 1 - 5 µl der Proteinlösung in 800 µl Aqua dest. gelöst, und anschliessend mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt. Nach zehnmütiger Inkubation im Dunkeln bei RT wurde die Absorptionsmessung bei 590 nm mit dem Novaspec® II Spektralphotometer von Pharmacia Biotech durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer mit BSA erstellten Eichkurve ermittelt.

3.4.2 Herstellung von Gesamtzell-Proteinextrakten aus Säugerzellen

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Kulturzellen wurden subkonfluent gewachsene Zellen mit 4 °C kaltem PBS gewaschen, und durch Abschaben geerntet. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 1500 g pelletiert, und der Überstand verworfen. Der Zellaufschluss erfolgte durch Resuspension in NP40-Lysepuffer, sowie Schütteln für 30 min bei 4 °C. Die Zelltrümmer wurden bei 52.000 g und 4 °C 30 min pelletiert, und der klare Überstand abgenommen. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm nach der Bradford-Methode (s. 3. 4. 1) bestimmt.

3.5 Protein-Protein- Interaktionsanalysen

3.5.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die analytische Gelelektrophorese von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen im diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli, 1970, mit SDS-Polyacrylamidgelen als Trägermatrix. Eine Komplexierung der Proteine mit SDS führt zu einem konstanten Ladung/Masse-Verhältnis, welches eine Trennung der Polypeptide nach ihrem Molekulargewicht möglich macht. Die Trenngele (im Bereich von 6 - 18 %, C-Wert: 2,7 %) und Sammelgele (5 %, C-Wert: 2,7) wurden nach Sambrook *et al.*, 1989, angefertigt (s. Tab. 9).

	Trenngel		Sammelgel	
	6 %	12 %	18 %	5 %
Acrylamid-Bis (30:0,8)	2 ml	4 ml	6 ml	833 µl
Aqua dest.	5,4 ml	3,4 ml	1,4 ml	2,9 ml
1,5 M (Lower) Tris, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
0,5 M (Upper) Tris, pH 6,8	-	-	-	1,25 ml
Temed	4 µl	4 µl	4 µl	5 µl
10 % APS	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl

Tab. 9: Eingesetzte Lösungen für ein Trenn- bzw. Sammelgel.

Die Gele wurden zwischen zwei abgedichtete, speziell angefertigte Glasplatten, die durch 0,7 - 1 mm breite „Spacer“ getrennt waren, gegossen. Diese Glasplatten wurden vor Benutzung gründlich mit Ethanol gereinigt. Die Trenngel-Lösung wurde bis zu 4/5 der maximalen Gelhöhe zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit n-Butanol überschichtet, um eine gleichmäßige Oberfläche zu erhalten. Nach Aushärtung des Trenngels und Entfernung des n-Butanols wurde über das Trenngel das Sammelgel geschichtet, in das ein Probenkamm eingesetzt wurde. Aufgrund des unterschiedlichen pH-Wertes der Gele ändert sich das Ionenverhältnis von Sammelgel zu Trenngel, sodass die zu trennenden Proteine im Sammelgel schneller laufen können, als im Trenngel. Dadurch werden sie beim Übergang der beiden Gele zu einer scharfen Lauffront konzentriert, um anschliessend gemeinsam in das höher vernetzte Trenngel einzutreten, wo sie nach ihrer Größe getrennt werden. Die Proteinproben (20 - 40 µg Gesamtprotein) wurden mit 1/5 Volumen SDS-Probenpuffer (Endkonzentration: 1 x SDS-Probenpuffer) versetzt, und 5 min bei 95 °C denaturiert (1mm Kamm: max. 60 µl). Das im Auftragspuffer enthaltene β-Mercaptoethanol reduziert dabei die Disulfidbrücken. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer Mini-Protean-II-Dual-SLAB-Kammer (Biorad, München). Die Proteine liefen bei 80 V in das Sammelgel ein. Nachdem die Bromphenolbande die Trennlinie erreicht hatte, wurde die Spannung auf 120 V (6 %ige Gele) bzw. 145 V (12 %ige Gele) erhöht, bis die Bromphenolbande gerade aus dem Gel herausgelaufen war. Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt, und das Trenngel entweder mit Coomassie-Blue angefärbt, oder auf Nitrozellulose transferiert.

Proteine in Polyacrylamidgelen können nach Fixierung mit dem organischen Farbstoff Coomassie-Blau visualisiert werden. Die Proteinfärbung mit Coomassie-Blau, welches unspezifisch an kationische und hydrophobe Seitenketten des Proteins bindet, erlaubt eine semiquantitative Färbung, was eine Abschätzung des Proteingehaltes der im Gel aufgetragenen Proben ermöglicht. Die Nachweisgrenze beträgt 100 - 50 ng. Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel eine Stunde in etwa 100 ml Gelfärbelösung geschwenkt, und mit 10 % Essigsäure und 12,5 % Isopropanol entfärbt, bis die Banden sichtbar wurden. Nach der Färbung konnten die Gele in Plastikfolie eingeschweisst und bei 4 °C aufbewahrt werden.

3.5.2 Western Blotting

Eine immunologische Charakterisierung der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wird durch den Westernblot (Harlow und Lane, 1988) ermöglicht. Dazu müssen die Proteine vom Trenngel auf einen geeigneten Trägerfilter, wie z. B. eine Nitrocellulose- oder Nylonmembran, überführt werden, wodurch eine exakte Kopie des Trennmusters der Proteinmoleküle erstellt wird. Dies kann durch Anlegen eines elektrischen Feldes, welches die durch das SDS negativ geladenen Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran „zieht“, erreicht werden.

Die transferierten Proteine können anschliessend mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Der Primärantikörper bindet an ein bestimmtes Epitop auf der Membran, und mit Hilfe eines sekundären Antikörpers, der mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, kann diese Bindung durch Chemilumineszenz gut nachgewiesen werden.

In Gegenwart von Wasserstoffperoxid katalysiert die Meerrettich-Peroxidase die Oxidation des Farbstoffes Luminol (ein zyklisches Diazylhydrazid), welcher dadurch in einen angeregten Zustand gebracht wird. Die Lichtemission, die beim Absinken des angeregten Luminols in den Grundzustand entsteht, führt zur Schwärzung eines aufgelegten Röntgenfilms. PAGE-Gele wurden in Transferpuffer (Transferpuffer für Proteine bis 180 kDa mit 0,0037 % SDS, für Proteine über 180 kDa mit 0,8 % SDS) äquibriert, und auf vier, ebenfalls in Transferpuffer getränkte, gleichgroße Whatman-Filterpapiere gelegt. Darauf wurde die zugeschnittene Membran (Hybond-C Extra, Amersham Life Science) platziert, die ebenfalls in Puffer getränkt worden war, gefolgt von nochmals 4 getränkten Filterpapieren. Es wurde darauf geachtet, dass alle Schichten gut durchtränkt waren, und sich keine Luftblasen bildeten. Dieses „Sandwich“ wurde so auf die Semi-Dry-Blot-Apparatur (BioRad) platziert, dass die Membran auf der Kathode zu liegen kam, gefolgt vom Gel. Das Elektroblothing erfolgte bei einer Stromstärke von $1,7 \text{ mA/cm}^2$ für eine Stunde (Proteine $< 180 \text{ kDa}$), bzw. zwei Stunden (Proteine $> 180 \text{ kDa}$).

Nach dem Transfer wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran eine Stunde lang mit $1 \times \text{TBS-T}/10 \%$ Milchpulver bei RT unter leichtem Schütteln blockiert, und anschließend zweimal fünf Minuten in $1 \times \text{TBS}/0,1 \%$ Tween 20 gewaschen. Danach wurde der Primärantikörper ebenfalls in $1 \times \text{TBS-T}$, 10% Milchpulver (Verdünnung 1:250 bis 1:5.000, je nach Antikörper) über Nacht appliziert. Die Membran wurde danach dreimal 10 min in $\text{TBS}/0,1 \%$ Tween 20 gewaschen, und anschließend mit einem sekundären Meerrettich-Peroxidase konjugierten Antikörper, der gegen den FC-Anteil des Primär-Antikörper gerichtet ist, für eine Stunde in $1 \times \text{TBS-T}/10 \%$ Milchpulver (Verdünnung 1:2.000 bis 1:150.000 nach Angabe des Herstellers) bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit $\text{TBS}/0,1 \%$ Tween 20 wurde Super-Signal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce) gemäß den Angaben des Herstellers auf der Membran verteilt, anschließend in eine Filmkassette gelegt, und mit Klarsichtfolie abgedeckt. Nach 5 Minuten Inkubationszeit wurde der Überschuss an Reagenz aus der Folie gestrichen. Je nach Chemilumineszenz folgte die Exposition eines Röntgenfilms gegen die Membran für 10 sec bis 3 h. Sollte die Membran anschließend weiteren Antikörperreaktionen unterzogen werden, wurden die bestehenden Antigen-Antikörperkomplexe durch Inkubation in $1 \times \text{TBS}/0,2 \%$ Tween 20 für 45 Minuten unter leichtem Schütteln dissoziiert. Danach wurde die Membran kurz in $1 \times \text{TBS}$ gewaschen und entweder der nächsten Antikörperreaktion unterzogen, oder in $1 \times \text{TBS}$ bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

4. Ergebnisse

Als Transkriptionsfaktoren erfüllen adenovirale E1A- Proteine essentielle Funktionen im viralen Replikationszyklus, da sie zum einen die Expression aller anderen viralen Gene aktivieren, und zum anderen die zelluläre Genexpression so modulieren, dass eine effiziente Virusvermehrung möglich ist (Bayley und Mymryk, 1994; Flint und Shenk, 1997). Die E1A- Proteine besitzen als Transkriptionsfaktoren keine sequenzspezifische DNA-Bindeaktivität (Ferguson *et al.*, 1985). Ihre genregulatorischen Funktionen werden durch die Interaktion mit zellulären, an der Transkriptionsregulation beteiligten Faktoren, vermittelt. Da sowohl virale DNA nach dem Eintritt in den Zellkern, als auch zelluläre DNA als Chromatin organisiert vorliegen, ist eine direkte bzw. indirekte Interaktion der E1A- Proteine mit Chromatin-remodellierenden Faktoren für die Aktivierung der Expression adenoviraler Gene, sowie für die Modulation der zellulären Genexpression, von besonderer Bedeutung. Zu Beginn meiner Untersuchungen waren bereits Interaktionen der E1A- Proteine mit Chromatin-modifizierenden und -remodellierenden Faktoren, wie z. B. p300/CBP, bekannt (Ait-Si-Ali *et al.*, 1998; Chakravarti *et al.*, 1999; Fax *et al.*, 2000). Auch gab es erste Erkenntnisse aus der Arbeitsgruppe von Prof. Esche (Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung), Universität Duisburg-Essen), dass E1A- Proteine mit der ATPase-Untereinheit BRG1 des ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden hSWI/SNF-Komplexes interagieren. Letztere Untersuchungen zeigten, dass adenovirale Promotoren, die ein CRE-Sequenzelement besitzen, durch die physikalische und funktionelle Interaktion von E1A-Proteinen mit Komponenten des hSWI/SNF-Komplexes, in ihrer Expression aktiviert und moduliert werden können.

Darauf aufbauend bestand die Fragestellung meiner Arbeit darin, ob die Expression spezifischer *zellulärer* Gene ebenfalls auf diese Weise durch adenovirale E1A- Proteine aktiviert und reguliert werden kann. Als zellulären Modellpromotor habe ich dafür den PCNA- Promotor gewählt, da

- (1) die E1A- Proteine aller Adenovirus Serotypen diesen Promotor aktivieren können, und
- (2) das PCNA- Genprodukt ein Schlüsselprotein in der Regulation der zellulären DNA-Synthese, und indirekt damit auch für die Replikation von DNA-Viren, darstellt.

4.1 Der PCNA- Promotor als zelluläres Modellsystem der funktionellen Interaktion von E1A und der ATPase BRG1 des SWI/SNF-Komplexes

Das Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) stellt eine wichtige regulatorische Komponente im eukaryontischen Zellzyklus sowie einen Schlüsselfaktor der DNA-Synthese und -Reparatur, und damit der Proliferationskontrolle, dar. Der Stellenwert dieses in der Literatur auch als Cyclin (Mathews *et al.*, 1984), oder als Kofaktor der DNA Polymerase δ (Tan *et al.*; 1986, Bravo *et al.*; 1987), bezeichneten Proteins, wird durch seinen hohen Grad evolutionärer Konservierung unterstrichen. Für die Untersuchungen wählten wir das PCNA- Gen aus, weil sein Promotor durch adenovirale E1A-Genprodukte (E1A_{13S}; E1A_{12S}) effizient aktiviert werden kann. Das entscheidende cis-aktivierende Promotorelement für die E1A- induzierte Transkription des PCNA- Promotors ist das CRE- (cyclic AMP responsive element) Element (Merino *et al.*, 1989), welches von dem cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktor CREB-1 gebunden wird. Dieser an das CRE-Element bindende Transkriptionsfaktor CREB-1 rekrutiert seinerseits das E1A- Protein an den PCNA- Promotor (Lee und Mathews, 1997). In einem weiteren Schritt wird der zelluläre Koaktivator p300/CBP, welcher für das transaktivierende Potential der Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1 von entscheidender Bedeutung ist (Montminy, 1997), an den Promotor rekrutiert, was zur Bildung eines ternären Komplexes aus CREB-1/ATF-1, dem Koaktivator p300/CBP, und dem E1A- Protein (Lee und Mathews 1997) führt. In diesem Promotor- gebundenen ternären Komplex wird die Histonacetyltransferase (HAT)-Aktivität von CPB/p300 durch E1A-Vermittlung aktiviert, was zur Acetylierung der aminoterminalen Enden der Histone H3 und H4, und so zu einer reversiblen und lokalen Änderung und Öffnung in der Chromatinstruktur führt. Die vorübergehende Öffnung der Chromatinstruktur in der Promotorregion erleichtert den Zugang von generellen Transkriptionsfaktoren, und ermöglicht damit die Aktivierung des Promotors. 2003 konnte Rozita Hashemi aus unserer Arbeitsgruppe erstmals eine Interaktion der E1A-Proteine mit dem ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden hSWI/SNF-Komplex bei der Expression CREB-abhängiger viraler Gene *in vitro* und *in vivo* zeigen, wobei eine Interaktion nur mit der ATP-ase Untereinheit BRG1 des hSWI/SNF-Komplexes nachgewiesen werden konnte. Analysen bezüglich des Aktivierungsmechanismus des viralen E2_{Ad12}- Modellpromotors über die ATP-abhängigen Chromatin-remodulierenden hSWI/SNF-Komplexe zeigten, dass ein Zusammenhang zwischen Histonacetylierung durch p300/CBP (aktiviert durch E1A-Funktionen), und der Beteiligung der hSWI/SNF-Komplexe an der Aktivierung des viralen E2_{Ad12}- Promotors besteht, da die Histondeacetylase-1 die hBRG1-vermittelte Aktivierung des adenoviralen E2_{Ad12}- Promotors inhibieren kann. Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren erstmals Untersuchungen zur Charakterisierung und Abfolge von E1A- vermittelten Aktivierungskaskaden in Kooperation

mit Chromatin-remodellierenden und -modulierenden Faktoren am Modellsystem des zellulären PCNA- Promotors, welcher ebenfalls eine CRE-Konsensussequenz enthält.

4.2 Klonierung geeigneter Promotor- Reporterkonstrukte zur Analyse der funktionellen Interaktion von E1A mit hBRG1 (SWI/SNF) in transienten Expressionsexperimenten

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde ein Genfragment des humanen PCNA-Promotors, welches ein CRE-Element enthält, in Transkriptionsrichtung vor ein Luciferase-Gen in den eukaryontischen Expressionsvektor pGL3-Luc der Fa. Promega Corporation kloniert (s. Abb. 12; 13). Die in den Basisvektor klonierten PCNA- Promotorsequenzen umfassten die Promotorregion von nt -249 bis nt +143 des PCNA- Promotors. Durch Mutationsanalysen konnte gezeigt werden (Morris und Mathews, 1990 und Ottavio *et al.*, 1990), dass von den 1,8 kbp des PCNA- Promotors nur die Sequenzen von -249 bis +143 für die Aktivierung des Promotors essentiell sind. Diese PCNA- Promotorsequenzen habe ich mit Hilfe der PCR unter Verwendung geeigneter Primer amplifiziert, gelelektrophoretisch angereichert, und über eine KpnI-Schnittstelle der „multi-cloning-site“ in den Vektor pGL3-Luc kloniert (s. Abb. 12).

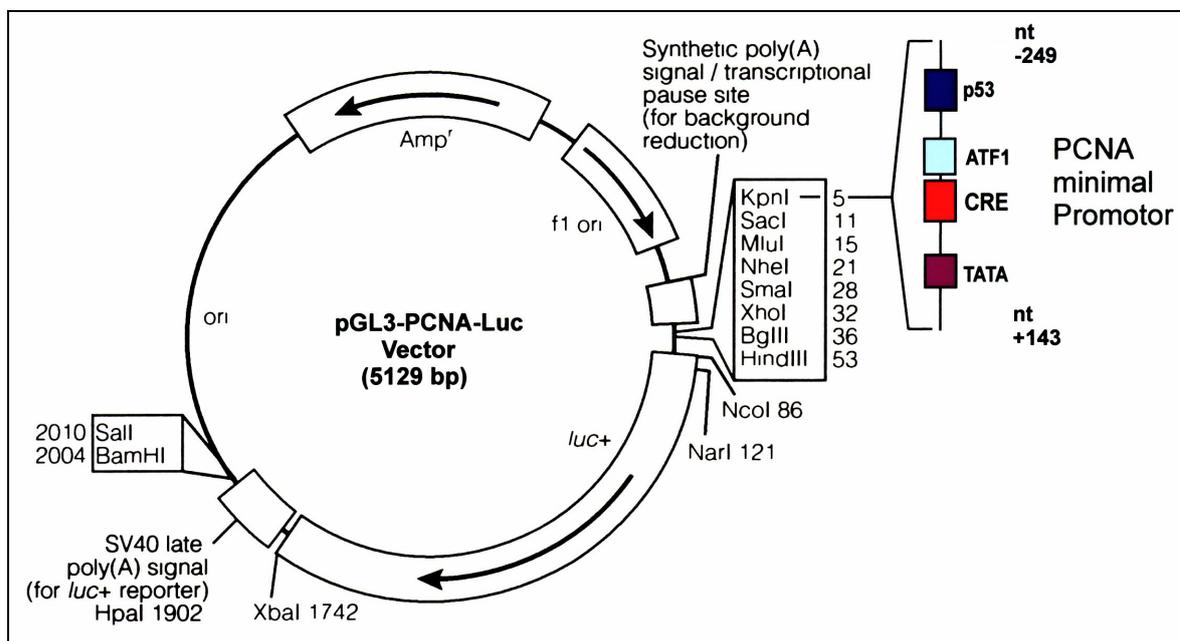


Abb. 12: Schematische Darstellung des klonierten Expressionsvektors pGL3-PCNA-Luc. Luc⁺: Kodierungsregion der Luciferase; Amp^r: Gen für Ampicillin-Resistenz in *E. coli*; f1 ori: Startpunkt der Replikation des filamentösen Bakteriophagen F1, und Startpunkt der Replikation des DNA-Vektors in *E. coli*; die Pfeile innerhalb der luc⁺ und Amp^r Gene geben die Richtung der Transkription an; der Pfeil im f1 Startpunkt zeigt die Richtung der ssDNA-Synthese an. Der PCNA minimal- Promotor wurde mit Hilfe geeigneter Oligonukleotide über die KpnI-Schnittstelle der multi cloning site des Vektors pGL3-Luc in den Vektor kloniert.

Abb. 13 zeigt die schematische Darstellung der in das Reporter-Konstrukt klonierten PCNA-Promotorsequenzen:

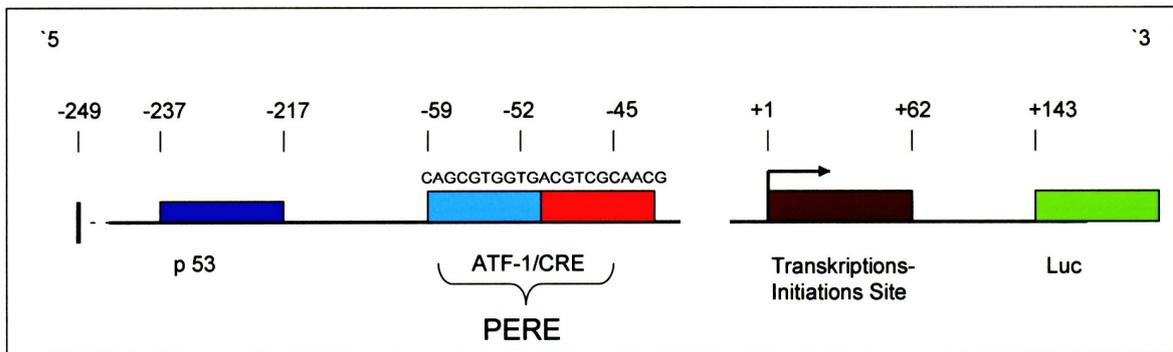


Abb. 13: Schematische Darstellung des minimalisierten zellulären PCNA- Promotors. Nach Morris und Mathews (1991) sind für einen funktionellen PCNA- Promotor die Bindungs-Sequenzen für die Transkriptionsfaktoren ATF-1, CREB, und p53 essentiell. Die Abbildung zeigt weiterhin die Lokalisation der Transkriptions-Initiations Site, und die sich anschließende Kodierungssequenz des Luciferase-Gens.

Zur Erstellung einer Negativkontrolle in den Promotoraktivitäts- Experimenten habe ich mit Hilfe der PCR und geeigneter Oligonukleotide zwei PCNA- Promotormutanten generiert, und ebenfalls in den Vektor pGL3-Luc kloniert. In einer Promotormutante wurden zwei Nukleotide in der CRE-Coresequenz ausgetauscht (GC → AT), und in einer zweiten Promotor- Mutante die Nukleotidsequenz des gesamten CRE-Elements deletiert (s. Abb.14).



Abb. 14: Schematische Darstellung der Promotorregion um das CRE-Element vom WT und den generierten CRE-Mutanten.

Alle in den Vektor pGL3-Luc klonierten PCNA- Promotorsequenzen wurden durch Sequenzierung durch die Firma Metabion in Martinsried auf ihre Richtigkeit und korrekte Orientierung im Vektor pGL3-Luc überprüft (s. Abb. 15).

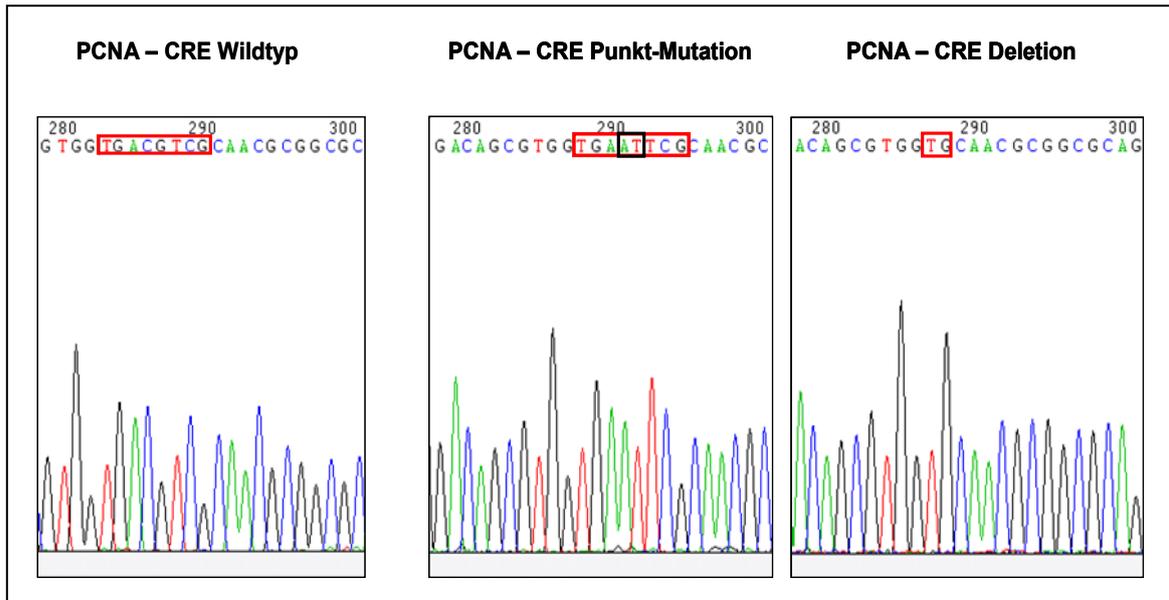


Abb. 15: Kontrollsequenzierungen der das CRE-Element enthaltenden Promotorregion des in den Vektor pGL3-Luc klonierten PCNA- Promotors und zweier Promotormutanten.

Expressionsvektoren, die das Protein hBRG1 (des SWI/SNF-Komplexes), hBRM, und die Histone-Deacetylase HDAC1 exprimieren, wurden von C. Muchardt, Dpt. Biotechnologies, Institut Pasteur, Paris, Frankreich (pBJ-hBRG1, pCG-hBRM) und A. Harel-Bellan, Laboratoire Oncogénèse, Différenciation et Transduction du Signal, Villejuif, Frankreich (pCMV-HA-HDAC1) zur Verfügung gestellt. Retrovirale Expressionsvektoren, die das E1A_{12S}- Protein des Adenovirus Typ 12 exprimieren (pRc/RSV-E1A_{12S}, Δ1-79/E1A_{12S}), wurden im eigenen Labor konstruiert und mir ebenfalls zur Verfügung gestellt. Alle diese Expressionsvektoren wurden von mir amplifiziert, gereinigt, und vor der Verwendung auf korrekte Expression der entsprechenden Proteine getestet.

4.3 Beteiligung ATP-abhängiger Chromatin-remodellierender Faktoren (hBRG1, hBRM) sowie der E1A- Proteine bei der Aktivierung des zellulären PCNA- Promotors

Um zu untersuchen, ob adenovirale E1A- Proteine auch im Falle des durch Ad12-induzierbaren zellulären PCNA- Promotors mit den Chromatin-remodulierenden Faktoren hBRG1 und hBRM funktionell interagieren, habe ich in transienten Expressionsanalysen das Reporterkonstrukt PCNA-WT-Luc mit den Expressionsvektoren für hBRG1 oder hBRM und/oder das E1A_{12S}- Protein in KB-Zellen transfiziert. Erwartungsgemäß führte die transiente Expression des E1A_{12S}- Proteins zu einer ca. 2,5 bis 3,5 fachen Aktivierung der Luc-Expression (Abb. 16 B und C). In Abwesenheit des E1A_{12S}- Proteins konnten hBRG1 und hBRM den PCNA- Promotor nur unwesentlich, um das ca. zweifache des Basalwertes, stimulieren. Die Koexpression von hBRG1 oder hBRM, und des E1A_{12S}- Proteins, führte dagegen zu einer 7- bis 10-fach erhöhten Aktivierung des PCNA-

Promotors, und entsprechend hoher Expression der Luciferase (s. Abb. 16 B und C). Um zu dokumentieren, dass in den transfizierten KB-Zellen hBRG1 und hBRM etwa in vergleichbaren Mengen exprimiert wurden, habe ich parallel einen Western-Blot mit den entsprechenden Extrakten unter Verwendung von anti-hBRG1 und anti-hBRM Antikörpern durchgeführt. Wie die Abb. 16 B und C zeigen, konnte ich sowohl die Expression von hBRG1, als auch hBRM, in den transfizierten Zellen der transienten Expressionsassays detektieren. Überraschend war, dass bei der Aktivierung des PCNA- Promotors das E1A_{12S}- Protein anscheinend neben BRG1 auch mit hBRM funktionell interagiert, was am frühen E2- Promotor des Adenovirus Typ12 nicht beobachtet werden konnte (Dissertationsschrift R. Hashemi, 2003).

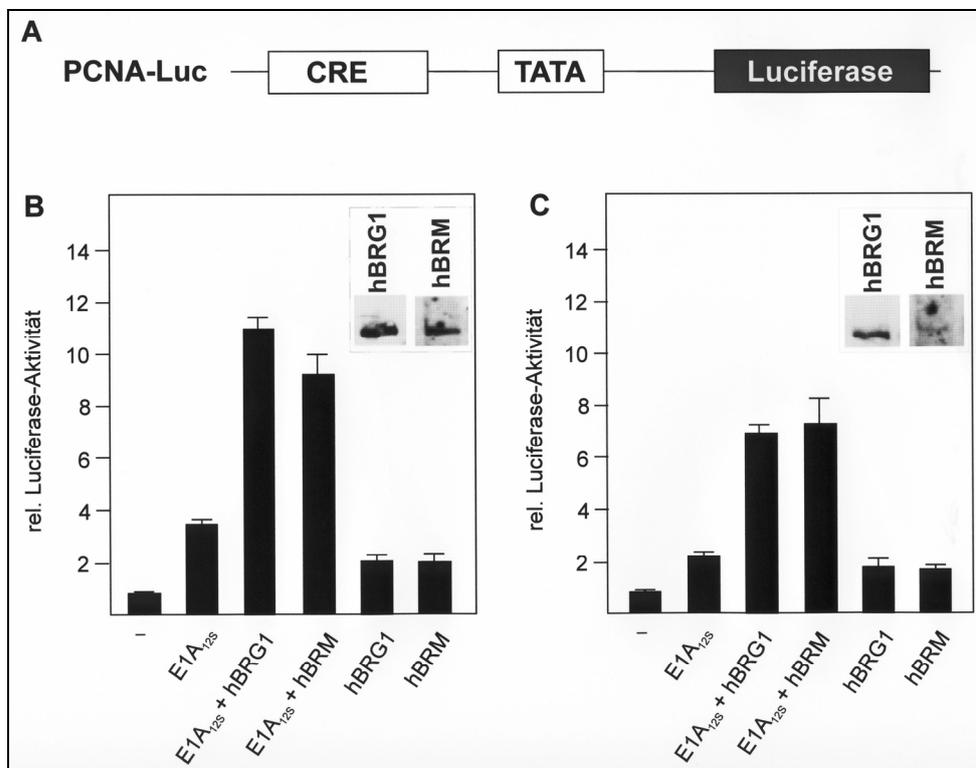


Abb. 16: Kooperation von hBRG1 und hBRM mit dem E1A_{12S}- Protein bei der Aktivierung des PCNA-Promotors.

A. Schematische Darstellung des eingesetzten Reporterkonstruktes PCNA-Luc. Die Luciferase-Genexpression im Reporterkonstrukt PCNA-Luc wird durch ein 392bp-Fragment des PCNA- Promotors reguliert (nt -249 bis nt +143). Das CRE-Element und die TATA-Box sind dargestellt.

B und **C.** Zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente, in denen KB-Zellen je mit 1 µg des Reporterkonstruktes PCNA-Luc und pRc/RSV-E1A_{12S}, pBJ5-hBRG1, und pCG-hBRM-Expressionsvektoren wie angegeben transfiziert wurden. Die Luciferase-Aktivität wurde 24 Stunden nach Transfektionsende bestimmt. Die relativen Aktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Messwerten. Die Promotoraktivität des Reporterkonstruktes PCNA-Luc in Anwesenheit des Leervektors pRc/RSV (ohne E1A_{12S}) wurde als 1 normiert. Gesamtzellextrakte von transfizierten KB-Zellen wurden mittels Western-Blot auf die Expression von hBRG1 und hBRM untersucht.

4.3.1 Für die PCNA- Promotoraktivität ist ein intaktes CRE-Motiv erforderlich

Zur Bestätigung einer Kooperation zwischen dem adenoviralen E1A_{12S}- Protein und hBRG1 am PCNA- Promotor wurden die Reporterkonstrukte mit den PCNA- Promotormutanten in den oben beschriebenen transienten Expressionsanalysen eingesetzt. Dem Reporterkonstrukt PCNA-Δ CRE-Luc wurde die CRE Coresequenz deletiert, im Reporterkonstrukt PCNA-PM-Luc zwei Nukleotide in der CRE-Sequenz ausgetauscht (CG → AT, s. Abb. 14).

Wie aus Abb. 17 ersichtlich, führt die Koexpression von E1A_{12S} und hBRG1 zu einer 6,5 fachen Aktivierung des PCNA-Luc-Reporterkonstruktes, während die Luciferaseexpression bei Verwendung der Reporterkonstrukte mit den PCNA- Promotormutanten kaum noch messbar war.

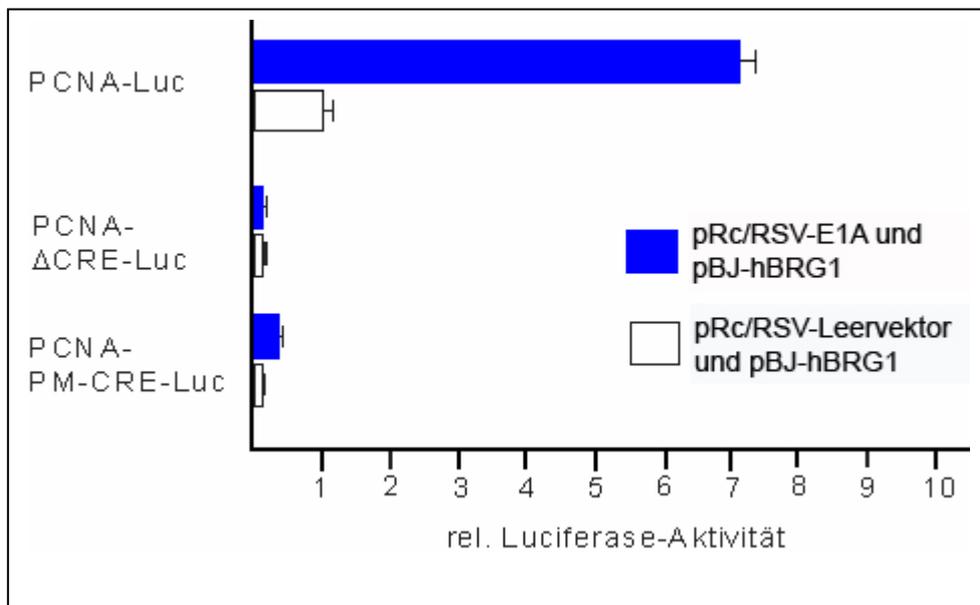


Abb. 17: Für die PCNA Promotor- Aktivität ist ein intaktes CRE-Motiv erforderlich. KB-Zellen wurden mit je 1 µg des Reporterkonstruktes PCNA-Luc, PCNA ΔCRE-Luc, oder PCNA-PM-CRE-Luc, und den Expressionsvektoren pRc/RSV-E1A_{12S} und pBJ5-hBRG1, oder pRc/RSV-Leervektor und pBJ5-hBRG1, wie angegeben transfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde 24 Stunden nach Transfektionsende bestimmt. Die relativen Aktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Messwerten. Die Promotoraktivität des Reporterkonstruktes PCNA-Luc in Anwesenheit des Leervektors pRc/RSV (ohne E1A_{12S}) wurde als 1 normiert.

4.3.2 Bedeutung der Ausbildung eines funktionellen ternären Komplexes aus CREB, p300/CBP, und E1A_{12S} an das CRE-Element des Promotors für die Aktivierung des PCNA minimal Promotors

In früheren Arbeiten konnte in der Arbeitsgruppe Esche durch Chromatin-Immunpräzipitationen in Kombination mit Western-Blots gezeigt werden, dass für die Aktivierung des adenoviralen E2-Promotors, welcher ein CRE-Element besitzt, ein ternärer Komplex aus CREB1, p300/CBP und E1A_{12S} verantwortlich ist. Phosphoryliertes CREB1 bindet an das CRE-Element des Promotors, und rekrutiert sodann p300/CBP, und das E1A_{12S}-Protein an den Promotor. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass das E1A_{12S}- Protein die Histon-Acetyltransferase (HAT) -Aktivität von p300/CBP moduliert/aktiviert. Letzteres führt zur Acetylierung der Histone H3 und H4 im Promotorbereich (s. Abb. 6), und zu einer partiellen Aktivierung des viralen E2- Promotors. Die Acetylierung der Histone H3 und H4, möglicherweise auch anderer Faktoren im Promotorbereich, ist, wie Rozita Hashemi in unserer Arbeitsgruppe zeigte, eine Voraussetzung für die Rekrutierung des hSWI/SNF-Komplexes an den Promotor, und die direkte Bindung von E1A_{12S} an die ATPase BRG1 des SWI/SNF-Komplexes.

Um zu untersuchen, ob der Aktivierungsmechanismus des adenoviralen E2- Promotors sich auch auf den zellulären PCNA- Promotor übertragen lässt, habe ich nachfolgende Experimente durchgeführt:

4.3.2.1 Transiente Expressionsexperimente mit einer dominant-negativen CREB-Mutante (A-CREB)

Die Arbeitshypothese für dieses Experiment beruht darauf, dass die dominant-negative A-CREB1-Mutante nicht mehr an das CRE- Promotor-Element binden kann, und somit kein ternärer Komplex aus CREB1, p300/CBP, und E1A_{12S} an das CRE-Element gebunden werden kann. Konsekutiv sollte der PCNA- Promotor keine Aktivität zeigen.

Hierzu wurden in KB-Zellen, die das Reporterkonstrukt PCNA-Luc enthielten, in Ab- und Anwesenheit von exogenem A-CREB, das E1A_{12S}-Protein und/oder hBRG1 exprimiert. Wie in Abb. 18 dargestellt, konnte der PCNA- Promotor in Gegenwart des A-CREB-1-Proteins erwartungsgemäß nicht mehr aktiviert werden.

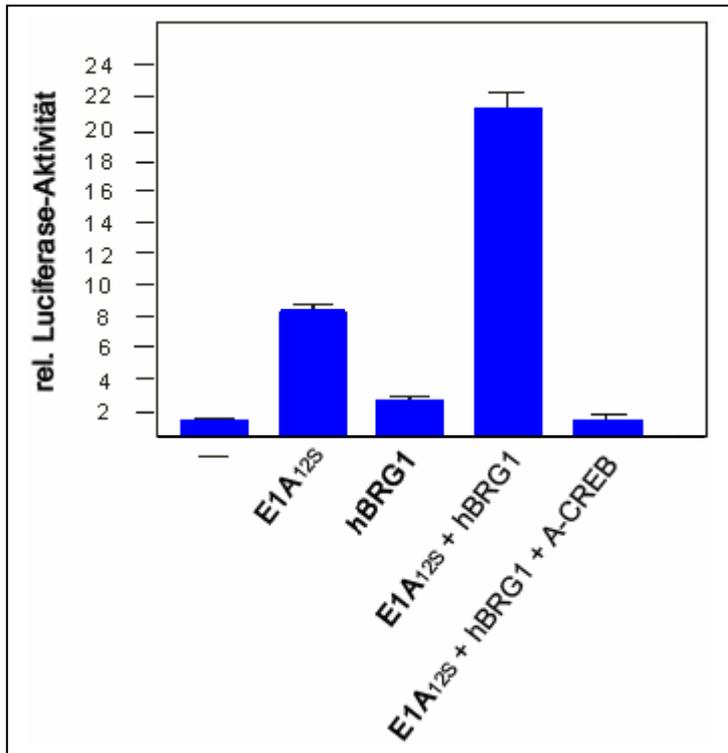


Abb. 18: Inhibition des PCNA- Promotors durch die dominant-negative Mutante A-CREB. KB-Zellen wurden je mit 1 µg des Reporterkonstruktes PCNA-Luc und pRc/CMV-A-CREB, pRc/RSV-E1A_{12S} und pBJ5-hBRG1- Expressionsvektoren wie angegeben transfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde 24 Stunden nach Transfektionsende bestimmt. Die relativen Aktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Messwerten. Die Promotoraktivität des Reporterkonstruktes PCNA-Luc in Anwesenheit des Leervektors pRc/ RSV (ohne E1A_{12S}) wurde als 1 normiert.

4.3.2.2 Transiente Expressionsexperimente mit einer E1A_{12S}- Mutante (Δ 1-79/E1A_{12S}) nach Deletion der aminoterminal gelegenen 79 Aminosäuren (N-Terminus und CR1)

In diesen Expressionsexperimenten habe ich KB-Zellen mit dem PCNA-Luc-Reporterkonstrukt, den Expressionsvektoren pBJ5-hBRG1 und pRc/RSV-E1A_{12S}, oder einem Expressionsplasmid, welches ein E1A-Mutantenprotein nach Deletion der aminoterminalen 79 Aminosäuren exprimiert (Δ 1-79/E1A_{12S}), kotransfiziert. Zwar kann diese Mutante noch an das CREB1-Protein binden, d. h. mit CREB1 und p300/CBP einen ternären Komplex am Promotor ausbilden, die Aktivierung der Histon-Acetyltransferase-Aktivität von p300/CBP kann jedoch nicht mehr vermittelt werden. Da, wie oben beschrieben, die Acetylierung der Histone H3 und H4 eine wichtige Voraussetzung für die Rekrutierung des hSWI/SNF-Komplexes an den Promotor darstellt, wäre zu erwarten, dass der PCNA- Promotor auch in Gegenwart von exogen exprimiertem hBRG1 bei Expression der Δ 1-79/ E1A_{12S}- Mutante inaktiv bleibt. Wie die Abb. 19 zeigt, ist der PCNA- Promotor in Gegenwart der Δ 1-79/E1A_{12S}- Mutante auch in Anwesenheit von exogen exprimiertem hBRG1 nahezu abgeschaltet.

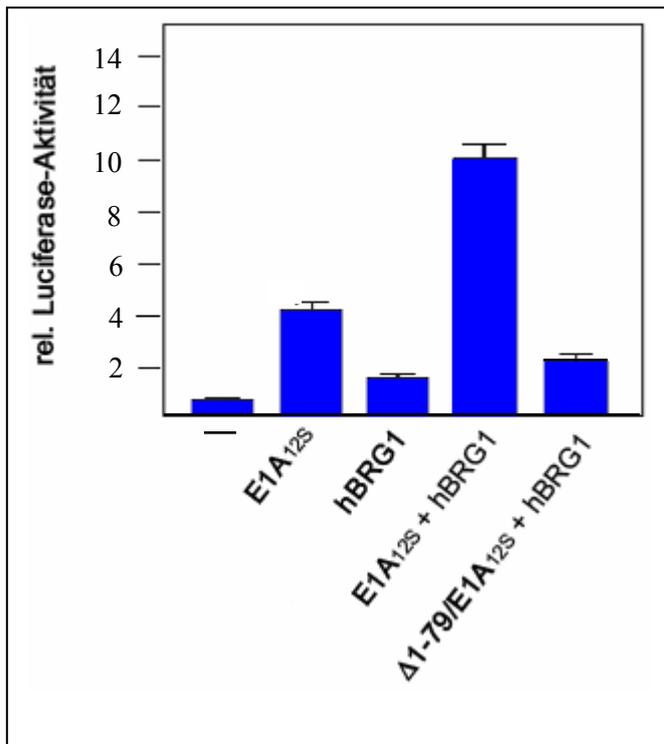


Abb. 19: Ein funktionelles aminoterminal Ende des E1A_{12S}- Proteins ist für die Aktivierung der PCNA- Promotoraktivität essentiell. KB-Zellen wurden mit je 1 µg des Reporterkonstruktes PCNA-Luc und den Expressionsvektoren pBJ5-hBRG1 und pRc/RSV-E1A_{12S}, oder Δ1-79/ E1A_{12S}, wie angegeben transfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde 24 h nach Transfektionsende bestimmt. Die relativen Aktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Messwerten. Die Promotoraktivität des Reporterkonstruktes PCNA-Luc in Anwesenheit des Leervektors pRc/RSV (ohne E1A_{12S}) wurde als 1 normiert.

4.3.3 Zusammenhang zwischen den HAT- Komplexen (p300/CBP; PCAF) und der hBRG1- vermittelten Aktivierung des PCNA- Promotors

Sowohl die Histonacetyltransferasen (HAT), als auch die ATP-abhängigen Chromatinremodellierenden Komplexe, tragen durch die Destabilisierung der repressiv wirkenden nukleosomalen Struktur zur Aktivierung der Transkription bei (Fyodorov und Kadonaga, 2001; Peterson, 2002). Da frühere Arbeiten von Rozita Hashemi aus der eigenen Arbeitsgruppe, und die oben von mir beschriebenen Experimente, zeigen, dass die Funktion von hBRG1 für die Aktivierung CREB-abhängiger, und E1A-induzierbarer Promotoren, entscheidend ist, sollte untersucht werden, ob zwischen der E1A_{12S}/BRG1-induzierten Aktivierung des PCNA- Promotors, und dem p300/CBP-vermittelten Acetylierungsprozess der Histonproteine eine Verbindung besteht. Hierzu habe ich in transienten Expressionsexperimenten in KB-Zellen, die das Reporterkonstrukt PCNA-Luc enthielten, in An- und Abwesenheit von HDAC1 das E1A_{12S}-Protein

und/oder hBRG1 exprimiert. Wie in Abb. 20 gezeigt, führte die Koexpression von E1A_{12S} und HDAC1 erwartungsgemäß zu einer Reduktion der Aktivität des Reportergens:

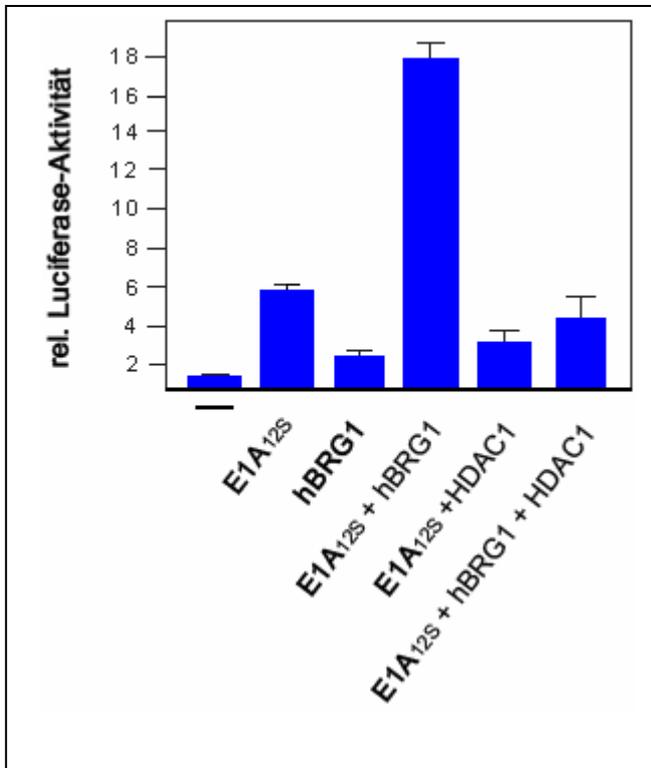


Abb. 20: Die Histondeacetylase HDAC1 reprimiert die hBRG1- vermittelte Aktivierung des PCNA-Promotors. KB-Zellen wurden je mit 1 µg des Reporterkonstruktes PCNA-Luc, und den Expressionsvektoren pBJ5-hBRG1, pRc/RSV-E1A_{12S} und pCMV-HA-HDAC1 wie angegeben transfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde 24 h nach Transfektionsende bestimmt. Die relativen Aktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Messwerten. Die Promotoraktivität des Reporterkonstruktes PCNA-Luc in Anwesenheit des Leervektors pRc/RSV (ohne E1A_{12S}) wurde als 1 normiert.

Die Aktivierung des PCNA-Promotors wurde auch im Falle der Expression von E1A_{12S} und hBRG1 durch Koexpression von HDAC1 stark reprimiert. Dies zeigt anschaulich, dass die Acetylierung von Histonen, und möglicherweise anderer Faktoren im Promotorbereich, durch p300/CBP eine essentielle Rolle für die Aktivierung des PCNA- Promotors durch ATP-abhängige Chromatin-remodellierende Komplexe, wie hSWI/SNF, spielt. Dass in diesen Experimenten die Reduktion der PCNA- Promotoraktivität durch HDAC1 nicht auf eine verminderte Expression des E1A_{12S}- Proteins oder BRG1 in den transfizierten Zellen zurückzuführen war, wurde durch Western-Blot-Analysen der für die transienten Expressionsanalysen eingesetzten Gesamtzell-extrakte bestätigt (Daten nicht gezeigt). Diese Daten bestätigen eindrucksvoll, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Histonacetylierung durch p300/CBP, und der hBRG1/SWI/SNF-vermittelten Aktivierung des PCNA- Promotors besteht.

Die oben beschriebenen Experimente bestätigen die Beobachtungen am adenoviralen E2-Promotor in der Form, dass der durch Adenovirus E1A-Proteine stimulierbare zelluläre PCNA-Promotor durch zumindest teilweise gleiche, an den Promotor bindende Faktoren, sowie eine genaue zeitliche Abfolge von Schritten aktiviert wird:

- (1) Durch die Bindung von CREB1 an das CRE-Element,
- (2) die Rekrutierung von p300/CBP und E1A_{12S} an den Promotor mit Bildung eines funktionellen ternären Komplexes,
- (3) die Acetylierung der Histone H3 und H4, und möglicherweise weiterer Faktoren im Promotorbereich,
- (4) die Rekrutierung von BRG1, sowie des SWI/SNF-Komplexes an den Promotor und
- (5) eine mögliche Stabilisierung des SWI/SNF-Komplexes am Promotor durch Acetylierung der Histone, sowie eine direkte Bindung von BRG1 und E1A_{12S} an den Promotor.

Die Aktivierungsschritte 3 bis 5 wurden von mir nur indirekt durch die Aktivierung des PCNA-Promotors gezeigt; experimentell wurden sie jedoch am E2_{Ad12}-Promotor schon von R. Hashemi (Dissertationsschrift R. Hashemi, 2003, Institut für Molekularbiologie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. rer. nat. H. Esche, Universität Duisburg-Essen) dokumentiert.

5. Diskussion

Die E1A- Proteine der Adenoviren sind als Transkriptionsfaktoren für die Aktivierung der Expression der adenoviralen Transkriptionseinheiten (E1B, E2, E3, E4 und L1-L5) essentiell (Berk, 1986). Neben der Regulation der viralen Gene modulieren sie auch die Expression spezifischer zellulärer Gene (Brockmann und Esche, 1995). Da die E1A- Proteine keine sequenzspezifische DNA-Bindeaktivität besitzen (Ferguson *et al.*, 1985), vermitteln sie ihre genregulatorischen Funktionen durch Protein-Protein-Interaktionen mit spezifischen zellulären Faktoren wie z. B. DNA-sequenzspezifisch-bindenden Transkriptionsfaktoren, Repressoren zellulärer Transkriptionsfaktoren, Faktoren des basalen Transkriptionsapparates, oder zellulären Koaktivatoren (s. 1. 6). Da die virale DNA, ähnlich wie die zelluläre DNA, im Zellkern in einer Chromatinstruktur organisiert vorliegt, ist die Interaktion der E1A- Proteine mit Chromatinremodellierenden Faktoren, wie z. B. Histonacetyltransferasen, oder ATP-abhängigen Chromatinremodellierenden Komplexen, für die Aktivierung der Expression der adenoviralen und zellulären Gene von besonderer Bedeutung.

Untersuchungen von R. Hashemi in unserer Arbeitsgruppe hatten zu Beginn meiner Arbeit bereits gezeigt, dass das E1A_{12S}-Protein von Adenoviren mit der ATPase Untereinheit BRG1 des hSWI/SNF-Komplexes physikalisch und funktionell interagiert, und diese Interaktion zur Aktivierung des frühen viralen E2_{Ad12}- Promotors entscheidend beiträgt. Es war weiterhin dokumentiert, dass eine Kooperation zwischen beiden Gruppen von Chromatinremodellierenden Proteinkomplexen, Histonacetyltransferasen und ATP-abhängigen hSWI/SNF-Komplexen, für die Aktivierung des adenoviralen E2_{Ad12}- Promotors notwendig ist. Eine Acetylierung der Histone H3 und H4, und möglicherweise weiterer am Promotor gebundener Faktoren, scheint eine Voraussetzung für die Rekrutierung des hSWI/SNF-Komplexes an den E2_{Ad12}- Promotor zu sein. Einen synergistischen Effekt der Histonacetyltransferase-Aktivität von p300/CBP für die Stabilisierung der SWI/SNF-Komplexe am Promotor wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Hassan *et al.*, 2001).

Ziel meiner Untersuchungen war es, herauszufinden, ob der zelluläre PCNA- Promotor, der analog zum viralen E2_{Ad12}- Promotor ein CRE-Element besitzt, und durch E1A- Proteine aktiviert werden kann, über den gleichen Mechanismus und die gleiche Abfolge von Aktivierungsschritten aktiviert werden kann:

(1) durch Bildung eines ternären Komplexes von CREB1, p300/CBP und E1A_{12S} an das CRE-Element des Promotors,

(2) der Vermittlung der Aktivierung der Histonacetyltransferase von p300/CBP durch das E1A_{12S}-Protein,

(3) der Acetylierung der Histone H3 und H4, und möglicherweise weiterer Promotor- gebundener Faktoren,

(4) der anschließenden Rekrutierung des hSWI/SNF-Komplexes an den Promotor, und eine mögliche Stabilisierung der Bindung des SWI/SNF-Komplexes an den Promotor durch Acetylierung der Histonden und eine direkte Bindung von E1A_{12S} an die ATPase-Untereinheiten hBRG1 oder hBRM des SWI/SNF-Komplexes.

Nur einen Teil der oben genannten Aktivierungsschritte konnte ich in meiner Arbeit für den PCNA- Promotor dokumentieren.

5.1 Interaktion der ATPase-Untereinheiten hBRG1 und hBRM der Chromatin-remodellierenden hSWI/SNF-Komplexe mit dem E1A_{12S} Protein bei der Aktivierung des PCNA- Promotors

Änderungen in der Chromatinstruktur bei der Aktivierung oder Reprimierung der Expression von Genen erfordern die enzymatische Aktivität von Histonacetyltransferasen (HATs), Histondeacetylasen (HDACs), und Nukleosom-remodellierenden Faktoren wie z. B. SWI/SNF-Komplexen (Cheung *et al.*, 2000; Aalfs und Kingston. 2000). Adenovirale E1A- Onkoproteine können bei der Regulation der Transkription einiger ihrer viralen, sowie spezifischen zellulären Gene, die Aktivität der Chromatin-modifizierenden Faktoren direkt oder indirekt beeinflussen (s. 1. 9). So wurde mehrfach belegt, dass die E1A- Proteine an zelluläre Koaktivatoren mit Histonacetyltransferase-(HAT-) Aktivität wie z. B. p300/CBP und PCAF binden, und dass diese Bindung für die Regulation der Genexpression durch die E1A- Proteine von essentieller Bedeutung ist.

In humanen Zellen wurden, wie in Kap. 1.8 beschrieben, verschiedene hSWI/SNF-Komplexe identifiziert. Diese Komplexe unterscheiden sich voneinander durch das Vorkommen der ATPase-Untereinheiten hBRG1 und hBRM, sowie einiger anderer BRG1/BRM-assoziiierter Faktoren (BAF). Die beiden hoch homologen ATPase-Untereinheiten der hSWI/SNF-Komplexe sind über die Bindung an zelluläre Faktoren (z. B. p105RB) an der Regulation der Zellproliferation und Zelldifferenzierung beteiligt. Über die Interaktion mit nukleären Rezeptoren, wie z. B. dem Glucocorticoid- und dem Östrogen-Rezeptor, sind sie zudem in der Aktivierung der Transkription einer Reihe Hormon-abhängiger Gene involviert (Strober *et al.*, 1996; Nie *et al.*, 2000; Belandia *et al.*, 2002). Trotz der funktionellen Gemeinsamkeiten scheint es, dass diese ATPase-Untereinheiten (hBRG1, hBRM) ihre biologischen Funktionen in den SWI/SNF-Komplexen an unterschiedlichen

Genen der Zelle ausüben. So konnte beispielsweise bei einigen hSWI/SNF-abhängigen Promotoren gezeigt werden, dass nur eine dieser ATPase-Untereinheiten, hBRG1 oder hBRM, an der Regulation der Expression des jeweiligen Gens beteiligt ist (Cosma 2002; Kadam und Emerson 2003). Die Chromatin-remodellierende Aktivität dieser ATPasen wird durch die Interaktion mit spezifischen Transkriptionsfaktoren an den Promotor rekrutiert. Die Funktionen der anderen Proteinuntereinheiten der hSWI/SNF-Komplexe sind noch weitgehend unbekannt.

In meinen Experimenten über die Aktivierung des PCNA- Promotors in transienten Expressionsassays habe ich nur eine funktionelle, jedoch keine direkte, physikalische Interaktion zwischen hBRG1 oder hBRM und dem adenoviralen E1A_{12S}-Protein nachgewiesen, da letzteres *in vitro* und *in vivo* schon von Rozita Hashemi in unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde. In diesen Experimenten, in denen sie die transkriptionelle Aktivierung des frühen adenoviralen E2_{Ad12}- Promotors untersuchte, konnte sie eine funktionelle Interaktion des E1A_{12S}-Proteins nur mit hBRG1 dokumentieren. Anscheinend ist an diesem viralen Promotor nur hBRG1 an der Aktivierung beteiligt.

Im Gegensatz hierzu konnte ich in meinen transienten Expressionsexperimenten zeigen, dass sowohl BRG1, als auch BRM, an der Aktivierung des zellulären PCNA- Promotors beteiligt sein können. Dieses Ergebnis könnte darauf hinweisen, dass weitere Promotor- spezifische Faktoren zusätzlich zur nukleosomalen Umgebung des Promotors Einfluß auf die Zusammensetzung der SWI/SNF-Komplexe für spezifische Promotoren, wie z. B. den PCNA- Promotor, haben. Lemon und Mitarbeiter konnten ebenfalls zeigen, dass die *in vitro* Transkriptionsaktivierung spezifischer Promotoren durch Hormonrezeptoren eine spezielle Zusammensetzung von SWI/SNF-Komplexen erfordert (Lemon *et al.*, 2001).

Eine Interaktion zwischen viralen transaktivierenden Proteinen und den ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden hSWI/SNF-Komplexen ist nicht auf das adenovirale E1A_{12S}-Protein beschränkt. So konnte beispielsweise die Interaktion von HIV-1-Integrase (Kalpana *et al.*, 1994), c-Myc (Cheng *et al.*, 1999), ALL-1 (Rozenblatt-Rosen *et al.*, 1998), EBNA2 (Wu *et al.*, 2000), und HPV-18 E1 (Lee *et al.*, 1999), mit einer der Core-Untereinheiten der hSWI/SNF-Komplexe (Ini 1) gezeigt werden. Diese Interaktionen tragen zu den genregulierenden Funktionen dieser Transkriptionsfaktoren bei. Zudem zeigen Daten der Arbeitsgruppe von Choe, dass das HPV-E7-Protein mit hBRG1 interagiert, und dass diese Interaktion für die transaktivierende Funktion des viralen Proteins von Bedeutung ist (Lee *et al.*, 2002).

Die von mir in den transienten Expressionsstudien zur Analyse des Aktivierungsmechanismus des zellulären PCNA- Promotors durch adenovirale E1A- Proteine beobachtete Aktivierung ist nicht auf eine hSWI/SNF-abhängige Überexpression von einigen der bekannten, an der PCNA-

Promotoraktivierung beteiligten Faktoren, wie z. B. CREB-1/ATF-1 oder p300/CBP zurückzuführen, wie wir durch Western-Blot-Analysen dokumentieren konnten (Daten nicht gezeigt). Meine Untersuchungen belegen zudem, dass die hBRG1-SWI/SNF-vermittelte Aktivierung des PCNA- Promotors durch eine funktionelle Interaktion des E1A_{12S}-Proteins mit der Histonacetyltransferase p300/CBP und hBRG1 bewirkt wird, da die E1A-Mutante Δ 1-79/E1A_{12S}, der der N-Terminus und die Domäne CR1 deletiert wurden, den PCNA- Promotor auch in Gegenwart von exogen exprimiertem BRG1 nicht aktivieren kann. Diese Ergebnisse zeigen, dass die BRG1-vermittelte Aktivierung des PCNA- Promotors von Funktionen des N-Terminus, und der CR1-Domäne des E1A_{12S}-Proteins, abhängig ist. Beide Domänen sind sowohl für die Bindung an hBRG1 in vitro und in vivo, als auch für die E1A-vermittelte Rekrutierung von hBRG1/hBRM an den Promotor, sowie für die Aktivierung der Histonacetyltransferase-Aktivität von p300/CBP im Promotor- gebundenen ternären Komplex (Fax *et al.*, 2000; Rozita Hashemi, Dissertationsschrift, 2003), verantwortlich.

In Übereinstimmung mit meinen Ergebnissen sind auch Daten der Arbeitsgruppe von Walfish, die zeigen, dass für die E1A-induzierte Aktivierung Thyroid-Hormon-abhängiger Promotoren in Hefen die Funktion von yeast (y)SWI/SNF-Komplexen entscheidend ist (Meng *et al.*, 2003). Obwohl bei diesen Untersuchungen keine Analysen zur Interaktion der E1A- Proteine mit ySWI/SNF-Komplexen durchgeführt wurden, weisen die Autoren aufgrund von E1A-Proteinmutanten nach, dass das N-terminale Ende der E1A- Proteine für diese Aktivierung essentiell ist.

Bekannt ist, dass die hSWI/SNF-Komplexe an der Regulation der Expression Zellzyklus-regulierender Gene beteiligt sind. Hinweisend hierfür sind Beobachtungen, dass viele Tumorzelllinien Mutationen zumindest in einer der Untereinheiten dieser Komplexe aufweisen (Decristofaro *et al.*, 2001). Zudem wurde gezeigt, dass Komponenten der hSWI/SNF-Komplexe direkt mit einer Reihe von Zellzyklus-regulierenden Proteinen interagieren (Bochar *et al.*, 2000; Muchardt and Yaniv, 2001; Lee *et al.*, 2002). Eines der wichtigsten solcher, die Proliferation regulierenden Proteine, ist das p105RB-Protein. Es spielt bei der Kontrolle der Expression von Genen, die für den Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus benötigt werden (u. a. Cyklin E, myb und E2F) eine essentielle Rolle.

Studien mit hBRG1- und hBRM-defizienten humanen Zelllinien (z. B. C33A- oder SW13-Zellen) haben gezeigt, dass für eine Inaktivierung des Transkriptionsfaktors E2F durch p105RB die Anwesenheit einer der ATPase-Untereinheiten der hSWI/SNF-Komplexe entscheidend ist (Zhang *et al.*, 2000; Strobeck *et al.*, 2001). Umgekehrt wurde gezeigt, dass die hBRG1-induzierte Arretierung der Zellen in der G1-Phase von einem funktionellen p105RB-Protein abhängig ist. Hierbei wurde eine Interaktion der beiden ATPase-Untereinheiten der hSWI/SNF-Komplexe mit

dem p105RB-Protein mehrfach nachgewiesen (Strober *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2000; Strobeck *et al.*, 2000). Interessanterweise konnte in allen diesen Studien der p105RB-hSWI/SNF-induzierte Zellzyklus-Arrest durch die Expression der adenoviralen E1A- Proteine aufgehoben werden (Dunaief *et al.*, 1994). Als möglichen Mechanismus für diese E1A- induzierte Aufhebung des Zellzyklus-Arrestes diskutierten die Autoren eine Konkurrenz der E1A- Proteine mit hBRG1 um die Bindung an p105RB. Dies wurde durch die Identifizierung des sog. LXCXE-Motivs in der Prolin-reichen Domäne von hBRG1, einem Aminosäuresequenzmotiv, welches für die Bindung an p105RB verantwortlich ist, und auch in anderen p105RB-bindenden Proteinen, wie z. B. HDAC1, HPV-E7, und SV40 T-Antigen, sowie in den adenoviralen E1A- Proteinen, vorkommt, unterstützt (Dunaief *et al.*, 1994).

Die im Zuge meiner Arbeit nochmals bestätigte Interaktion des E1A_{12S}-Proteins mit hBRG1 bringt neue Einsichten auch in die E1A-induzierte Zellzyklus-Regulation. So könnte zusätzlich zur Bindung des E1A- Proteins an das p105RB-Protein die direkte Interaktion der E1A- Proteine mit dem hSWI/SNF-Komplex als möglicher Grund der E1A-induzierten Aufhebung des Zellzyklus-Arrestes in Frage kommen. Hierfür sprechen auch Daten anderer Arbeitsgruppen, die gezeigt haben, dass Mutationen in der LXCXE-Bindedomäne von p105RB, welche die Interaktion von p105RB mit E1A- Proteinen stark reprimiert, keinen Einfluss auf die Bindung von hBRG1 an das p105RB-Protein haben (Dahiya *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000). So kann zumindest eine Konkurrenz der E1A- Proteine mit hBRG1 um die Bindung an das p105RB-Protein nicht als einziger Mechanismus für die Aufhebung des hSWI/SNF-p105RB-induzierten Zellzyklus-Arrestes in Betracht gezogen werden. Dies könnte durch weitere Analysen mit E1A- bzw. hBRG1-bindungsdefizienten Proteinmutanten zukünftig verifiziert werden.

5.2 Der hSWI/SNF- abhängige Aktivierungsmechanismus des PCNA-Promotors

Weder ATP-abhängige, remodelierende Komplexe, noch Histon-modifizierende Komplexe können unspezifisch an DNA binden; ihre Aktivität an spezifischen Promotoren wird daher zeitlich und räumlich durch Protein-Protein-Interaktionen reguliert. Eine wichtige Rolle kommt hierbei sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren zu, welche durch ihre direkte Bindung an spezifische Promotorsequenzen in der Lage sind, nicht DNA-bindende Faktoren wie z. B. Histonacetyltransferasen, Histondeacetylasen, und ATP-abhängige DNA-remodelierende Faktoren, an den Promotor zu rekrutieren.

Meine Untersuchungen dokumentieren, dass für die Aktivierung des PCNA- Promotors sowohl die Chromatin-remodelierende Funktion der hSWI/SNF-Komplexe, als auch die Aktivität der

Histonacetyltransferasen (p300/CBP) erforderlich ist. Diese Beobachtung steht in Einklang mit Ergebnissen einer Reihe von Expressionsstudien mit SWI/SNF-abhängigen Genen, die die Beteiligung von Chromatin-remodifizierenden Faktoren an der Aktivierung dieser Gene zeigen. So wurde beispielsweise in Hefezellen gezeigt, dass, obwohl die Inaktivierung beider Chromatin-remodellierenden Komplexe (SWI/SNF, HATs) für die Zellen letal ist, Mutationen in einem dieser Komplexe nur zu einer verminderten Expression dieser Gene führt (Pollard und Peterson, 1997; Roberts und Winston, 1997). Anscheinend können die Funktionen einer der Chromatin-remodellierenden Komplexe zum Teil durch Funktionen der anderen Komplexe ersetzt werden. Untersuchungen zu den Rekrutierungsmechanismen der SWI/SNF- und HAT-Komplexe in Hefen und humanen Zellen belegen, dass die Aktivität dieser Komplexe durch die Interaktion mit Aktivatoren an den jeweiligen Promotor rekrutiert wird (Utley *et al.*, 1998; Natarajan *et al.*, 1999; Yudkovsky *et al.*, 1999; Krebs *et al.*, 2000). Hierbei kann jedoch kein allgemein gültiger Mechanismus für die Rekrutierung dieser Chromatin-remodellierenden Komplexe beobachtet werden. Vielmehr lassen diese Untersuchungen vermuten, dass die Rekrutierung der Chromatin-remodellierenden Komplexe abhängig vom jeweiligen Promotor spezifisch erfolgt. Die Aktivator-abhängige Rekrutierung der beiden Chromatin-remodellierenden Komplexe kann unabhängig voneinander, z. B. im Falle des Hefe PHO5- Promotors (Syntichaki *et al.*, 2000), oder in Abhängigkeit von der Funktion des jeweils anderen Chromatin-remodellierenden Komplexes, erfolgen. Bekannte Beispiele für den letzteren Fall sind der HO- Promotor (Cosma *et al.*, 1999; Krebs *et al.*, 1999), bzw. der IFN-beta- Promotor (Agalioti *et al.*, 2000). Bei der Aktivierung beider Promotoren ist die Funktion einer dieser Chromatin-remodellierenden Komplexe für die anschließende Rekrutierung des anderen Komplexes notwendig.

Meine Daten belegen, dass es bei der Aktivierung des CREB-abhängigen PCNA- Promotors zu einer E1A_{12S}- abhängigen Assoziierung entweder von hBRG1, oder hBRM an den PCNA-Promotor kommt (s. 4. 3). Die Untersuchungen haben weiterhin gezeigt, dass bei der Aktivierung des PCNA- Promotors eine Abhängigkeit zwischen den Funktionen der hSWI/SNF-Komplexe, und denen der zellulären p300/CBP-Histonacetyltransferasen besteht. Die Überexpression von Histondeacetylase-1 (HDAC1) in transienten Expressionsanalysen führte sowohl in Gegenwart von E1A_{12S}-Proteinen, als auch in Gegenwart von E1A_{12S}- Proteinen und hBRG1, zu einer starken Repression der PCNA- Promotor-Aktivierung (s. 4. 3. 3). Diese Daten sprechen dafür, dass die Acetylierung von Histonproteinen durch die Koaktivatoren p300/CBP, sowie möglicherweise auch anderer am Promotor gebundener Faktoren, eine Voraussetzung für die hSWI/SNF-vermittelte Aktivierung des PCNA- Promotors ist.

Für die Repression der hBRG1-vermittelten Aktivierung des PCNA- Promotors durch die Histondeacetylase-1 kommt eine Reihe von möglichen Erklärungen in Betracht:

So könnte die Acetylierung von Histonen entweder

- (1) die Aktivität von hBRG1 stimulieren, oder
- (2) eine Voraussetzung für die Rekrutierung des hBRG1-SWI/SNF-Komplexes an den Promotor sein.

Es wäre auch denkbar, dass

- (3) die Acetylierung von hBRG1 selbst für die Aktivierung der ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden Funktion des Proteins von Bedeutung ist.

Da bereits durch Huang und Mitarbeiter gezeigt wurde, dass die Chromatin-remodellierende Aktivität des hBRG1-Proteins durch acetylierte Histonproteine nicht induziert bzw. verändert wird (Huang *et al.*, 2003), kann dieser Mechanismus zur Modulation der hBRG1-Funktion weitgehend ausgeschlossen werden.

Eine Reihe von Daten sprechen dafür, dass die Acetylierung von Histonproteinen für die Rekrutierung von hBRG1 an den PCNA- Promotor essentiell ist. Zum Beispiel hat R. Hashemi in unserer Arbeitsgruppe zeigen können, dass die Histondeacetylase-1 die Assoziierung von hBRG1 an den adenoviralen E2_{Ad12}- Promotor in vivo weitgehend inhibieren kann, und dass zumindest die Acetylierung des mit dem E2_{Ad12}- Promotor-assoziierten Histon H4 für die Rekrutierung bzw. die Stabilisierung von hBRG1 an den E2_{Ad12}- Promotor entscheidend ist. Diese Ergebnisse werden auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt, welche die Bedeutung der Histonacetylierung bei der Stabilisierung der Bindung von hSWI/SNF-Komplexen an den Promotor gezeigt haben (Agalioti *et al.*, 2002; Hassan *et al.*, 2002).

Auch sprechen zahlreiche Fakten dafür, dass die Rekrutierung der SWI/SNF-Komplexe an den Promotor nicht allein von der Acetylierung der Histonproteine, sondern zusätzlich von einer Interaktion dieser Komplexe mit weiteren, Promotor- spezifischen Transkriptionsfaktoren abhängig ist. Z. B. sind die SWI/SNF-Komplexe in Hefezellen nur an der Regulation von ca. 7 % der Gene beteiligt (Holstege *et al.*, 1998). Die Regulation zahlreicher weiterer Hefe-Gene wird nur durch die Funktion von yHAT reguliert. Sollte nur die Histonacetylierung allein die Rekrutierung von ySWI/SNF-Komplexen an den Promotor bewirken, könnte auch die Beteiligung der ySWI/SNF-Komplexe an der Regulation dieser Gene erwartet werden. Zudem sind nur 100 bis 200 Kopien der SWI/SNF-Komplexe im Kern der Hefezellen vorhanden (Côté *et al.*, 1994).

Diese Fakten lassen zusätzlich die Existenz Promotor- spezifischer Faktoren zur Rekrutierung von γ SWI/SNF-Komplexen vermuten. Unterstützt wird diese Vermutung durch Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Huang und Mitarbeitern (2003), wonach eine alleinige Acetylierung von Histonproteinen für die Rekrutierung der SWI/SNF-Komplexe nicht ausreicht.

Somit lassen sich folgende Schlussfolgerungen aus meinen Ergebnissen ziehen: Im Falle des zellulären PCNA- Promotors muß eine direkte Interaktion des E1A_{12S}-Onkoproteins mit der BRG1- oder BRM-Untereinheit der hSWI/SNF-Komplexe für die spezifische Rekrutierung dieser Komplexe angenommen werden. Das E1A_{12S}-Protein wird durch Bindung an die zellulären Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1 an den PCNA- Promotor rekrutiert, und ist für die Rekrutierung des BRG1-SWI/SNF-Komplexes an den Promotor, und vermutlich auch für die Stabilisierung am Promotor, verantwortlich. Hierfür sprechen die Daten, dass Proteinmutanten mit einer Deletion der aminoterminal gelegenen 79 Aminosäuren des E1A_{12S}-Proteins den BRG1-enthaltenden hSWI/SNF-Komplex nicht mehr effizient an den PCNA- Promotor rekrutieren, und somit den Promotor auch nicht mehr aktivieren können (s. 4. 3. 2). Auch Studien anderer Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Promotorsystemen zeigen, dass die Interaktion mit Promotor- spezifischen Transkriptionsfaktoren für eine Rekrutierung und stabile Bindung von SWI/SNF-Komplexen an den jeweiligen Promotor entscheidend ist (Natarajan *et al.*, 1999; Yudkovsky *et al.*, 1999; Neely *et al.*, 1999).

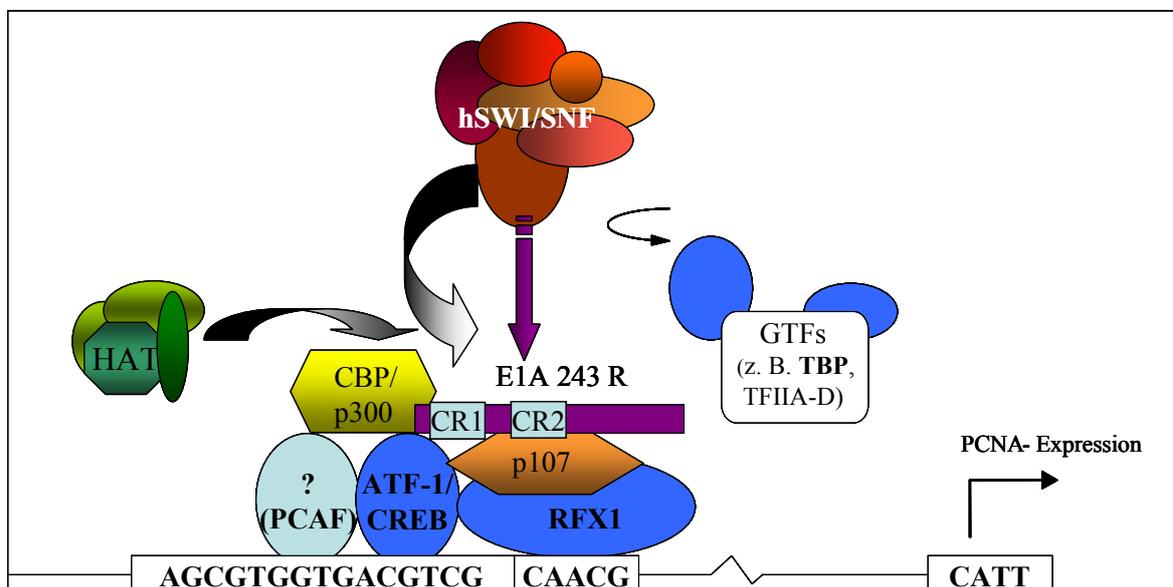


Abb. 21: Hypothetisches Modell der Aktivierung des PCNA- Promotors durch sequenzspezifische Rekrutierung von hSWI/SNF durch das E1A Protein im CBP-CREB-PERE Signalweg. Die SWI/SNF-Komplexe können durch direkte Interaktion mit den E1A- Proteinen, durch acetylierte Histonproteine (H3; H4), sowie höchstwahrscheinlich durch weitere, Promotor- spezifische Faktoren an den Promotor rekrutiert und stabil gebunden werden. Dabei nimmt das E1A- Protein eine zentrale Brückenfunktion zwischen ATF1, TBP, und den Chromatin-remodellierenden Faktoren ein, wodurch möglicherweise die Bildung einer Plattform für das RNA-Polymerase II-Holoenzym erleichtert werden kann.

Abb. 21 zeigt ein hypothetisches Modell der Aktivierung des PCNA- Promotors durch das E1A_{12S}- Protein in Kooperation mit den hSWI/SNF-Komplexen. Der Effekt von SWI/SNF auf die RB-Checkpoint-Kontrolle (p107) erfordert keine direkte Bindung, die Aktivierung des PCNA-Promotors wird vielmehr durch die cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktoren CREB-1/ATF-1 vermittelt. In Kooperation mit den SWI/SNF-Komplexen ist das E1A- Protein in der Lage, die Repression von p107/RFX1 aufzuheben, und den Promotor durch das cis-regulatorische PERE-Element zu aktivieren (s. Abb. 21). Sowohl der N-Terminus und die Region CR1 (interagieren mit p300/CBP), als auch die Region CR2 (interagiert mit p105/p107) des E1A_{12S}-Proteins, sind für die optimale Induktion des PCNA-Promotors erforderlich. CBP besitzt intrinsische HAT-Aktivität, die HAT-Domäne von CBP ist in unmittelbarer Nachbarschaft der E1A-Bindungsstelle lokalisiert. Die daraus resultierende Acetylierung der mit dem Promotor assoziierten Histonproteine stellt eine wichtige Prerequisite für die anschließende Rekrutierung der hSWI/SNF-Komplexe durch das E1A_{12S}-Protein an den Promotor dar. Die Chromatin-remodellierenden Aktivitäten sowohl der hBRG1-, als auch der hBRM-Untereinheit, können möglicherweise durch Erleichterung der Bindung des RNA-Polymerase-II-Holoenzym an den Initiationskomplex entscheidend zur Aktivierung des PCNA-Promotors beitragen.

Wie die HAT-Komplexe, stellen auch die ATP-abhängigen Chromatin-remodellierenden hSWI/SNF-Komplexe zelluläre Zielproteine der E1A- Onkoproteine dar. Die Bindung an die hSWI/SNF-Komplexe ermöglicht es den E1A- Proteinen, die Expression sowohl viraler Gene im Replikationszyklus des Adenovirus, als auch zellulärer, replikationsrelevanter Gene, wie des PCNA-Gens, zu aktivieren. Die ATP-abhängige Chromatin-remodellierende Funktion der BRG1-/BRM-Untereinheit der hSWI/SNF-Komplexe destabilisiert die nukleosomale Struktur im Promotorbereich, und ermöglicht dadurch eine verbesserte Zugänglichkeit des Promotors für den generellen Transkriptionsapparat, bzw. andere regulatorische Proteine. Hierdurch wird eine effiziente Expression von adenoviralen oder spezifischen zellulären Genen gewährleistet.

Die funktionelle Interaktion zwischen HAT- und SWI/SNF-Komplexen mit den E1A-Onkoproteinen im Aktivierungsprozess CREB-abhängiger zellulärer Zielgene durch den cAMP/PKA-abhängigen Signaltransduktionsweg wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben.

Durch die Interaktion der E1A- Proteine mit den hSWI/SNF-Komplexen stehen den adenoviralen Proteinen zudem möglicherweise bisher unbekannte Mechanismen zur Modulation der zellulären Regulationsprozesse in infizierten und/oder transformierten Zellen zur Verfügung.

6. Zusammenfassung

Ziel meiner Untersuchungen waren Promotorstudien zum Aktivierungs- sowie Kontrollmechanismus des zellulären Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)- Gens unter besonderer Berücksichtigung der funktionellen Interaktion des E1A_{12S} Onkoproteins mit Chromatin-remodellierenden Faktoren (SWI/SNF-Komplexe). Analog zum viralen E2_{Ad12}-Promotor konnte ich eine funktionelle Interaktion zwischen den Adenosin-5'-triphosphat (ATP)-utilisierenden Untereinheiten humanes (h)BRG-1 und auch hBRM der SWI/SNF-Komplexe mit dem E1A_{12S} Protein bei der Aktivierung des zellulären PCNA- Promotors nachweisen. Dabei kommt es zu einer E1A-abhängigen Assoziierung, entweder von hBRG1 oder hBRM, an diesen CREB- abhängigen Promotor. Folgende zeitliche Abfolge von Aktivierungsschritten kann für die Genexpression dieses zellulären PCNA- Schlüsselproteins angenommen werden: (1) Bildung eines ternären Komplexes durch Bindung von phosphoryliertem CREB1 an die CRE- Konsensussequenz des Promotors, und anschließende Rekrutierung der Kofaktoren p300/CBP, sowie von E1A_{12S}; (2) Vermittlung der Aktivierung der Histonacetyltransferase (HAT)- Aktivität von p300/CBP durch das E1A_{12S}- Protein; (3) Acetylierung der Histone H3 und H4, und möglicherweise weiterer Promotor- gebundener Faktoren; (4) anschließende Rekrutierung des hSWI/SNF- Komplexes an den Promotor; und (5) eine mögliche Stabilisierung des SWI/SNF- Komplexes am Promotor durch Acetylierung der Histonenden, sowie eine direkte Bindung von E1A_{12S} an die ATPase-Untereinheiten hBRG1 oder hBRM. Wie durch transiente Expressionsexperimente mit einer E1A_{12S}- Mutante ($\Delta 1-79/E1A_{12S}$) gezeigt, ist ein funktionelles aminoterminales Ende des E1A_{12S}- Proteins (N-Terminus und CR1) für die Aktivierung der PCNA- Promotoraktivität essentiell, da die eingesetzte Mutante nicht mehr in der Lage ist, die HAT- Aktivität zu modulieren. Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass zusätzlich zur nukleosomalen Umgebung des Promotors weitere Promotor- spezifische Faktoren Einfluss auf die Zusammensetzung der hSWI/SNF-Komplexe für spezifische Promotoren, wie z. B. den PCNA- Promotor, haben könnten. Da die Histondeacetylase-1 die hBRG1- vermittelte Aktivierung des PCNA- Promotors in transienten Expressionsexperimenten reprimieren kann, stellt die HAT-Aktivität eine wichtige Prerequisite für die Rekrutierung der hSWI/SNF-Komplexe an den Promotor dar. Diese kann über die Acetylierung von Histonen koordiniert werden (Daten nicht gezeigt). Die Bedeutung der funktionellen Interaktion zwischen HAT- und SWI/SNF-Komplexen mit den E1A Onkoproteinen im Aktivierungsprozess zellulärer Gene des cAMP/PKA- Signaltransduktionsweges wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben. Meine Ergebnisse ermöglichen zudem neue Einsichten in die E1A- induzierte Zellzyklusregulation, da die direkte Interaktion der E1A-Proteine mit den Untereinheiten hBRG1, und auch hBRM, der SWI/SNF-Komplexe als möglicher Grund der E1A-induzierten Aufhebung des Zellzyklus-Arrestes in Betracht gezogen werden muss.

7. Literaturverzeichnis

1. Aalfs J. D. und Kingston R. E. (2000):
What does 'chromatin remodeling' mean?
Trends Biochem Sci. 25 (11): 548-55.
2. Adams P. D. und Kaelin W. G. Jr. (1998):
Negative control elements of the cell cycle in human tumors.
Curr Opin Cell Biol. 10 (6): 791-7.
3. Agalioti T., Lomvardas S., Parekh B., Yie J., Maniatis T. und Thanos D. (2000):
Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter.
Cell. 103 (4): 667-78.
4. Ait-Si-Ali S., Ramirez S., Barre F. X., Dkhissi F., Magnaghi-Jaulin L., Girault J. A., Robin P., Knibiehler M., Pritchard L. L., Ducommun B., Trouche D. und Harel-Bellan A. (1998):
Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle-dependent kinases and oncoprotein E1A.
Nature. 396 (6707): 184-6.
5. Angel P. und Karin M. (1991):
The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell- proliferation and transformation.
Biochim Biophys Acta. 1072 (2-3): 129-157.
6. Arany Z., Newsome D., Oldread E., Livingston D. M. und Eckner R. (1995):
A family of transcriptional adaptor proteins targeted by the E1A oncoprotein.
Nature. 374 (6517): 81-4.
7. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidmann J. G., Smith J.A., Struhl K. (1987):
Current Protocols in Molecular Biology. 5. Ed.
New York: Greene Wiley-Interscience.
8. Avvakumov N., Wheeler R., D'Halluin J. C., Mymryk J. S. (2002):
Comparative sequence analysis of the largest E1A proteins of human and simian adenoviruses.
J Virol. 76 (16): 7968-75.

9. Babiuk L. A. und Tikoo S. K. (2000):
Adenoviruses as vectors for delivering vaccines to mucosal surfaces.
J Biotechnol. 83 (1-3): 105-13.
10. Bailey A. und Mautner V. (1994):
Phylogenetic relationships among adenovirus serotypes.
Virology. 205 (2): 438-452.
11. Bannister A. J. und Kouzarides T. (1996):
The CBP co-activator is a histone acetyltransferase.
Nature. 384 (6610): 641-3.
12. Bayley S. T. und Mymryk J. S. (1994):
Adenovirus E1A proteins and transformation. (Review)
Int J Oncol. 5: 425-444.
13. Belandia B., Orford R. L., Hurst H. C. und Parker M. G. (2002):
Targeting of SWI/SNF chromatin remodelling complexes to estrogen-responsive genes.
EMBO J. 21 (15): 4094-103.
14. Bergelson J. M., Cunningham J. A., Droguett G., Kurt-Jones E. A., Krithivas A.,
Hong J. S., Horwitz M. S., Crowell R. L. und Finberg R. W. (1997):
Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5.
Science. 275 (5304): 1320-3.
15. Berger S. L. (2002):
Histone modifications in transcriptional regulation.
Curr Opin Genet Dev. 12 (2): 142-8.
16. Berk A.J. und Sharp P.A. (1978):
Structure of the adenovirus 2 early mRNAs.
Cell. 14 (3): 695-711.
17. Berk A. J., Lee F., Harrison T., Williams J. und Sharp P. A. (1979):
Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs.
Cell. 17 (4): 935-44.
18. Berk A. J. (1986):
Adenovirus promoters and E1A transactivation.
Ann Rev Genet. 20: 45-79.

19. Berk A. J., Boyer T. G., Kapanidis A. N., Ebright R. H., Kobayashi N. N., Horn P. J., Sullivan S. M., Koop R., Surby M. A. und Triezenberg S. J. (1998):
Mechanisms of viral activators.
Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 63: 243-252.
20. Bertani G. (2004):
Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems.
J Bacteriol. 186 (3): 595-600.
21. Birnboim H. C. und Doly J. A. (1979):
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Res. 7 (6): 1513-23.
22. Bochar D. A., Wang L., Beniya H., Kinev A., Xue Y., Lane W. S., Wang W., Kashanchi F. und Shiekhattar R. (2000):
BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer.
Cell. 102 (2): 257-65.
23. Boulanger P. A. und Blair G. E. (1991):
Expression and interactions of human adenovirus oncoproteins.
Biochem J. 275 (Pt 2): 281-99.
24. Bradford M. M. (1976):
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal Biochem. 72: 248-54.
25. Bravo R., Frank R., Blundell P.A. und Macdonald-Bravo, H. (1987):
Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta.
Nature. 326 (6112): 515-7.
26. Brockmann D., Tries B. und Esche H. (1990):
Isolation and characterization of novel adenovirus type 12 E1A mRNAs by cDNA PCR technique.
Virology. 179 (2): 585-90.

27. Brockmann D. und Esche H. (1995):
Regulation of viral and cellular gene expression by E1A proteins encoded by the oncogenic adenovirus type 12.
Curr Top Microbiol Immunol. 199 (Pt 3): 81-112. Review.
28. Brockmann D., Fax P., Hashemi R., Kullmann S., Lehmkuhler O., Nolte C., und Esche H.(2001):
Adenovirus E1A: A functional link between transcription factors and co-activators.
Recent Res Devel Virol. 3: 277-295.
29. Burgert H. G., Maryanski J. L. und Kvist S. (1987):
“E3/19K“ protein of adenovirus type 2 inhibits lysis of cytolytic T lymphocytes by blocking cell-surface expression of histocompatibility class I antigens.
Proc Natl Acad Sci USA. 84 (5): 1356-60.
30. Chakravarti D., Okryzko V., Kao H. Y., Nash A., Chen H., Nakatani Y. und Evans R. M. (1999):
A viral mechanism for inhibition of p300 and PCAF acetyltransferase activity.
Cell. 96 (3): 393-403.
31. Cheng S. W., Davies K. P., Yung E., Beltran R. J., Yu J. und Kalpana G. V. (1999):
c-Myc interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function.
Nat Genet. 22 (1): 102-5.
32. Cheung P., Allis C. D. und Sassone-Corsi P. (2000):
Signaling to chromatin through histone modifications.
Cell. 103 (2): 263-71.
33. Cosma M. P., Tanaka T. und Nasmyth K. (1999):
Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter.
Cell. 97 (3): 299-311.
34. Cosma M. P. (2002):
Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation.
Mol Cell. 10 (2): 227-36.

35. Côté J., Quinn J., Workman J. L. und Peterson C. L. (1994):
Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex.
Science. 265 (5168): 53-60.
36. Cullen B. R. (2001):
Journey to the center of the cell.
Cell. 105 (6): 697-700.
37. Dahiya A., Gavin M. R., Luo R. X. und Dean D. C. (2000):
Role of the LXCXE binding site in Rb function.
Mol Cell Biol. 20 (18): 6799-805.
38. Decristofaro M. F., Betz B. L., Rorie C. J., Reisman D. N., Wang W.,
und Weissman B. E. (2001):
Characterization of SWI/SNF protein expression in human breast cancer cell lines and other malignancies.
J Cell Physiol. 186 (1): 136-45.
39. Deissler H. und Opalka B. (2007):
Therapeutic transfer of DNA encoding adenoviral E1A.
Recent Pat Anticancer Drug Discov. 2 (1): 1-10.
40. Doerfler W. (1969):
Nonproductive infection of baby hamster kidney cells (BHK21) with adenovirus type 12.
Virology. 38 (4): 587-606.
41. Dunaief J. L., Strober B. E., Guha S., Khavari P. A., Alin K., Luban J., Begemann M.,
Crabtree G. R. und Goff S. P. (1994):
The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest.
Cell. 79 (1): 119-30.
42. Eagle H. (1955):
Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB.
Proc Soc Exp Biol Med. 89 (3): 362-4.
43. Edelman J. und Nemunaitis J. (2003):
Adenoviral p53 gene therapy in squamous cell cancer of the head and neck region.
Curr Opin Mol Ther. 5 (6): 611-7.

44. Esche H. und Siegmann B. (1982):
Expression of early viral gene products in adenovirus type 12 -infected and -transformed cells.
J Gen Virol. 60 (Pt 1): 99-113.
45. Fax P., Lehmkuhler O., Kuhn C., Esche H. und Brockmann D. (2000):
E1A_{12S}- mediated activation of the adenovirus type 12 E2 promoter depends on the histone acetyltransferase activity of p300/CBP.
J Biol Chem. 275 (51): 40554-60.
46. Felgner P. L. und Ringold G. M. (1989):
Cationic liposome-mediated transfection.
Nature. 337 (6205): 387-8.
47. Ferguson B., Krippel B., Andrisani O., Jones N., Westphal H. und Rosenberg M. (1985):
E1A 13S and 12S mRNA products made in Escherichia coli both function as nucleus-localized transcription activators but do not directly bind DNA.
Mol Cell Biol. 5 (10): 2653-61.
48. Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M., Griffin D. E., Lamb R. A., Martin M. A., Roizman B., Straus S. E. (1985):
Field's Virology. 5. Ed.
Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer Health.
49. Flint J. und Shenk T. (1997):
Viral transactivating proteins.
Annu Rev Genet. 31: 177-212.
50. Flint J. und Broker T. R. (1981):
Lytic Infection by Adenoviruses.
In: Tooze J., Acheson N. H. (Eds.): Molecular Biology of Tumor Viruses.
2. Ed. S. 443-547.
New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
51. Fuchs M., Gerber J., Drapkin R., Sif S., Ikura T., Ogryzko V., Lane W.S., Nakatani Y. und Livingston D. M. (2001):
The p400 complex is an essential E1A transformation target.
Cell. 106 (3): 297-307.

52. Fyodorov D. V. und Kadonaga J. T. (2001):
The many faces of chromatin remodeling: SWItching beyond transcription.
Cell. 106 (5): 523-5.
53. Gabler S., Schütt H., Groitl P., Wolf H., Shenk T. und Dobner T. (1998):
E1B 55-kilodalton-associated protein: a cellular protein with RNA-binding activity
implicated in nucleocytoplasmic transport of adenovirus and cellular mRNAs.
J Virol. 72 (10): 7960-71.
54. Gallimore P. H. und Turnell A. S. (2001):
Adenovirus E1A: remodelling the host cell, a life or death experience.
Oncogene. 20 (54): 7824-35.
55. Gariglio P., Llopis R., Oudet P. und Chambon P. (1979):
The template of the isolated native simian virus 40 transcriptional complexes is a
minichromosome.
J Mol Biol. 131 (1): 75-105.
56. Gey G., Coffman W. und Kubicek M. T. (1952):
Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal
epithelium.
Cancer Res. 12: 264-65.
57. Gooding L. R., Elmore L. F., Tollefson A. E., Brody H. A. und Wold W. S. M. (1988):
A 14.700 MW protein from the E3 region of adenovirus inhibits cytolysis by tumor
necrosis factor.
Cell. 53: 341-346.
58. Gooding L. R., Aquino L., Day D., Horton T. M., Yei S. P. und Wold W. S. (1991):
The E1B 19.000 molecular-weight-protein of group C adenoviruses prevents tumor
necrosis factor cytolysis of human cells but not of mouse cells.
J Virol. 65 (6): 3083-94.
59. Grunstein M. (1998):
Yeast heterochromatin: regulation of its assembly and inheritance by histones.
Cell. 93: 325-8.
60. Hanahan D. (1983):
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.
J Mol Biol. 166 (4): 557-580.

61. Harlow E. und Lane D. (1988):
Using Antibodies: A Laboratory Manual. 2. Ed.
New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
62. Hassan, A. H., Neely K. E. und Workman J. L. (2001):
Histone acetyltransferase complexes stabilize swi/snf binding to promoter nucleosomes.
Cell. 2001. 104 (6): 817-27.
63. Hassan A. H., Prochasson P., Neely K. E., Galasinski S. C., Chandy M.,
Carrozza M. J. und Workman J. L. (2002):
Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes
to promoter nucleosomes.
Cell. 111 (3): 369-79.
64. Holstege F. C., Jennings E. G., Wyrick J. J., Lee T. I., Hengartner C. J., Green M. R.,
Golub T. R., Lander E. S. und Young R. A. (1998):
Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome.
Cell. 95: 717-728.
65. Horwitz M. S., Scharff M. D. und Maizel J. V. Jr. (1969):
Synthesis and assembly of adenovirus 2. I. Polypeptide synthesis, assembly of
capsomeres and morphogenesis of the virion.
Virology. 39 (4): 682-94.
66. Horwitz M. S. (1990):
Adenovirus.
In: Fields B. N. & Knipe D. M. (Eds.): Virology. 5. Ed. S. 1723-40.
New York: Raven Press.
67. Huang Z.-Q., Li J., Sachs L. M., Cole P. A. und Wong J. (2003):
A role for cofactor-cofactor and cofactor-histone interactions in targeting p300, SWI/SNF
and Mediator for transcription.
EMBO J. 22: 2146-2155.
68. Ikeda M. A. und Nevins J. R. (1993):
Identification of distinct roles for separate E1A domains in disruption of E2F complexes.
Mol Cell Biol. 13 (11): 7029-35.

69. Janknecht R. und Hunter T. (1996):
Transcription. A growing coactivator network.
Nature. 383(6595): 22-3.
70. 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 (8): 3665-9.
71. Jones N. (1995):
Transcriptional modulation by the adenovirus E1A gene.
Curr Top Microbiol Immunol. 199 (Pt 3): 59-80.
72. Jothikumar N., Cromeans T. L., Hill V. R., Lu X., Sobsey M. D., Erdman D. D. (2005):
Quantitative real-time PCR assays for detection of human adenoviruses and identification of serotypes 40 and 41.
Appl Environ Microbiol. 71 (6): 3131-6.
73. Kadam S. und Emerson B. M. (2003):
Transcriptional specificity of human SWI/SNF BRG1 and BRM chromatin remodeling complexes.
Mol Cell. 11 (2): 377-89.
74. Kalpana G. V., Marmon S., Wang W., Crabtree G. R. und Goff S. P. (1994):
Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5.
Science. 266 (5193): 2002-6.
75. Kimelman D. (1986):
A novel general approach to eucaryotic mutagenesis functionally identifies conserved regions within the adenovirus 13S E1A polypeptide.
Mol Cell Biol. 6 (5): 1487-96.
76. Kingston R. E. und Narlikar G. J. (1999):
ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity.
Genes Dev. 13 (18): 2339-52.
77. Kornberg R. D. und Lorch Y. (1999):
Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome.
Cell. 98 (3): 285-94.

78. Kovar H., Fallaux F. J., Pribill I., Jugovic D., Bartl S., Ambros P. F., Aryee D. N., Wiegant J. C. und Hoeben R. C. (2000):
Adenovirus E1A does not induce the Ewing tumor-associated gene fusion EWS-FLI1.
Cancer Res. 60 (6): 1557-60.
79. Kovesdi I., Reichel R., und Nevins J. R. (1986):
Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation.
Cell. 45 (2): 219-28.
80. Krebs J.E., Kuo M.H., Allis C.D. und Peterson C. L. (1999):
Cell cycle-regulated histone acetylation required for expression of the yeast HO gene.
Genes Dev. 13(11): 1412-21.
81. Krebs J. E., Fry C. J., Samuels M. L. und Peterson C. L. (2000):
Global role for chromatin remodeling enzymes in mitotic gene expression.
Cell. 102 (5): 587-98.
82. Krebs J. E. und Peterson C. L. (2000):
Understanding "active" chromatin: a historical perspective of chromatin remodeling.
Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 10 (1): 1-12.
83. Kuball J., Wen S. F., Leissner J., Atkins D., Meinhardt P., Quijano E., Engler H., Hutchins B., Maneval D. C., Grace M. J., Fritz M. A., Störkel S., Thüroff J. W., Huber C. und Schuler M. (2002):
Successful adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients with bladder cancer by intravesical vector instillation.
J Clin Oncol. 20 (4):957-65.
84. Labrie C., Morris G. F. und Mathews M. B. (1993):
A complex promoter element mediates transactivation of the human proliferating cell nuclear antigen promoter by the 243-residue Adenovirus E1A oncoprotein.
Mol Cell Biol. 13 (3): 1697-1707.
85. Laemmli U. K. (1970):
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature. 227 (5259): 680-5.

86. Lee J. S., Zhang X. und Shi Y. (1996):
Differential interactions of the CREB/ATF family of transcription factors with p300 and adenovirus E1A.
J Biol Chem. 271 (30): 17666-74.
87. Lee B. H. und Mathews M. B. (1997):
Transcriptional coactivator cAMP response element binding protein mediates induction of the human proliferating cell nuclear antigen promoter by the adenovirus E1A oncoprotein.
Proc Natl Acad Sci USA. 94 (9): 4481-6.
88. Lee D., Sohn H., Kalpana G. V. und Choe J. (1999):
Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA.
Nature. 399 (6735): 487-91.
89. Lee D., Kim J. W., Seo T., Hwang S. G., Choi E. J. und Choe J. (2002):
SWI/SNF complex interacts with tumor suppressor p53 and is necessary for the activation of p53-mediated transcription.
J Biol Chem. 277 (25): 22330-7.
90. Leibovitz A., McCombs W. M. 3rd, Johnston D., McCoy C. E. und Stinson J. C. (1973):
New human cancer cell culture lines. I. SW-13, small-cell carcinoma of the adrenal cortex.
J Natl Cancer Inst. 51 (2): 691-7.
91. Lemon B., Inouye C., King D. S. und Tjian R. (2001):
Selectivity of chromatin-remodelling cofactors for ligand-activated transcription.
Nature. 414: 924-928.
92. Lewis J. B. und Mathews M. B (1980):
Control of adenovirus early gene expression: a class of immediate early products.
Cell. 21 (1): 303-13.
93. Lipinski K. S., Esche H. und Brockmann D. (1998):
Amino acids 1-29 of the adenovirus serotypes 12 and 2 E1A proteins interact with rap30 (TF (II) F) and TBP in vitro.
Virus Res. 54 (1): 99-106.

94. Liu Y. C., Marraccino R. L., Keng P. C., Bambara R. A., Lord E. M., Chou W. G. und Zain S. B (1989):
Requirement for proliferating cell nuclear antigen expression during stages of the Chinese hamster ovary cell cycle.
Biochemistry. 28 (7): 2967-74.
95. Lundblad J. R., Kwok R. P., Laurance M. E., Harter M. L., Goodman R. H. (1995):
Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP.
Nature. 374 (6517): 85-8.
96. Mathews M. B., Bernstein R. M., Franza B. R. Jr. und Garrels J. I. (1984):
Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin.
Nature. 309 (5966): 374-6.
97. Melkonyan H., Sorg C. und Klempt M. (1996):
Elektroporation efficiency in mammalian cells is increased by dimethyl sulfoxide (DMSO).
Nucleic Acids Res. 24 (21): 4356-7.
98. Melot T. und Delattre O. (1999):
E1A and the Ewing tumor translocation.
Nat Med. 5 (12): 1331.
99. Meng X., Yang Y. F., Cao X., Govindan M. V., Shuen M., Hollenberg A. N., Mymryk J. S. und Walfish P. G. (2003):
Cellular context of co-regulator and adaptor proteins regulates human adenovirus 5 early region 1A-dependent gene activation by the thyroid hormone receptor.
Mol Endocrinol. 17 (6): 1095-105.
100. Meric F., Liao Y., Lee W. P., Pollock R. E. und Hung M. C. (2000):
Adenovirus 5 early region 1A does not induce expression of the ewing sarcoma fusion product EWS-FLI1 in breast and ovarian cancer cell lines.
Clin Cancer Res. 6 (19): 3832-6.
101. Merino A., Buckbinder L., Mermelstein F. H. und Reinberg D. (1989):
Phosphorylation of cellular proteins regulates their binding to the cAMP response element.
J Biol Chem. 264 (35): 21266-76.

102. Montminy M. R. und Bilezikjian L. M. (1987):
Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene.
Nature. 328 (6126): 175-8.
103. Montminy M. (1997):
Transcriptional regulation by cyclic AMP.
Annu Rev Biochem. 66: 807-22.
104. Morris G. F. und Mathews M. B. (1990):
Analysis of the proliferating cell nuclear antigen promoter and its response to adenovirus early region 1.
J Biol Chem. 265 (27): 16116-25.
105. Morris G. F. und Mathews M. B. (1991):
The adenovirus E1A transforming protein activates the proliferating cell nuclear antigen promoter via an activating transcription factor site.
J Virol. 65 (12): 6397-406.
106. Muchardt C. und Yaniv M. (2001):
When the SWI/SNF complex remodels...the cell cycle.
Oncogene. 20 (24): 3067-75.
107. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. und Erlich H. (1986):
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.
Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 51 Pt 1: 263-73.
108. Narlikar G. J., Fan H.Y. und Kingston R. E. (2002):
Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription.
Cell. 108 (4): 475-87.
109. Natarajan K., Jackson B. M., Zhou H., Winston F. und Hinnebusch A. G. (1999):
Transcriptional activation by Gcn4p involves independent interaction with the SWI/SNF complex and the SRB/mediator.
Mol Cell. 4 (4): 657-64.

110. Neely K. E., Hassan A. H., Wallberg A. E., Steger D. J., Carins B. R., Wright A. P. und Workman J. L. (1999):
Activation domain-mediated targeting of the SWI/SNF complex to promoters stimulates transcription from nucleosome arrays.
Mol Cell. 4 (4): 649-55.
111. Nevins J. R., Ginsberg H. S., Blanchard J. M., Wilson M. C. und Darnell J. E. Jr. (1979):
Regulation of the primary expression of the early adenovirus transcription units.
J Virol. 32(3): 727-33.
112. Nevins J. R. (1981):
Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product.
Cell. 26 (2 Pt 2): 213-20.
113. Nie Z., Xue Y., Yang D., Zhou S., Deroo B. J., Archer T. K., Wang W. (2000):
A specificity and targeting subunit of a human SWI/SNF family-related chromatin-remodeling complex.
Mol Cell Biol. 20 (23): 8879-88.
114. Ottavio L., Chang C. D., Rizzo M. G., Travali S., Casadevall C. und Baserga R. (1990):
Importance of introns in the growth regulation of mRNA levels of the proliferating cell nuclear antigen gene.
Mol Cell Biol. 10 (1): 303-9.
115. Paunesku T., Mittal S., Protic M., Oryhon J., Korolev S. V., Joachimiak A. und Woloschak G. E. (2001):
Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome.
Int J Radiat Biol. 77 (10): 1007-1021.
116. Perricaudet M., le Moullec J. M., Tiollais P. und Pettersson U. (1980):
Structure of two adenovirus type 12 transforming polypeptides and their evolutionary implications.
Nature. 288 (5787): 174-6.
117. Peterson C. L. (2000):
ATP-dependent chromatin remodeling: going mobile.
FEBS Lett. 476 (1-2): 68-72.

118. Peterson C. L. (2002):
Chromatin remodeling enzymes: taming the machines.
Third in review series on chromatin dynamics.
EMBO Rep. 3 (4): 319-22.
119. Philipson L. (1983):
Structure and assembly of adenoviruses.
Curr Top Microbiol Immunol. 109: 1-52.
120. Pilder S., Moore M., Logan J. und Shenk T. (1986):
The adenovirus E1B-55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmatic stabilization of viral and host cell mRNAs.
Mol Cell Biol. 6 (2): 470-6.
121. Pollard K. J. und Peterson C. L. (1997):
Role for ADA/GCN5 products in antagonizing chromatin-mediated transcriptional repression.
Mol Cell Biol. 17 (11): 6212-22.
122. Puri P. L., Sartorelli V., Yang X. Y., Hamamori Y., Ogryzko V. V., Howard B. H., Kedes L., Wang J. Y., Graessmann A., Nakatani Y. und Levrero M. (1998):
Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation.
Mol Cell. 1 (1): 35-45.
123. Reid J. L., Bannister A. J., Zegerman P., Martinez-Balbás M. A., Kouzarides T. (1998):
E1A directly binds and regulates the P/CAF acetyltransferase.
EMBO J. 17: 4469-447.
124. Reisman D., Glaros S. und Thompson E. A. (2009):
The SWI/SNF complex and cancer.
Oncogene. 28 (14): 1653-68.
125. Roberts C. W. und Orkin S. H. (2004):
The SWI/SNF complex--chromatin and cancer.
Nat Rev Cancer. 4 (2): 133-42.
126. Roberts S. M. und Winston F. (1997):
Essential functional interactions of SAGA, a *Saccharomyces cerevisiae* complex of Spt, Ada, and Gcn5 proteins, with the Snf/Swi and Srb/mediator complexes.
Genetics. 147 (2): 451-65.

127. Roelvink P. W., Lizonova A., Lee J. G., Li Y., Bergelson J. M., Finberg R. W., Brough D. E., Kovesdi I. und Wickham T. J. (1998):
The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F.
J Virol. 72 (19): 7909-15.
128. Rowe W. P., Huebner R. J., Gilmore L. K., Parrott R. H. und Ward T. G. (1953):
Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture.
Proc Soc Exp Biol Med. 84 (3): 570-73.
129. Rozenblatt-Rosen O., Rozovskaia T., Burakov D., Sedkov Y., Tillib S., Blechman J., Nakamura T., Croce C. M., Mazo A. und Canaani E. (1998):
The C-terminal SET domains of ALL-1 and TRITHORAX interact with the INI1 and SNR1 proteins, components of the SWI/SNF complex.
Proc Natl Acad Sci USA. 95 (8): 4152-7.
130. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989):
Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3. Ed.
New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
131. Sanchez-Prieto R., de Alava E., Palomino T., Guinea J., Fernandez V., Cebrian S., LLeonart M., Cabello P., Martin P., San Roman C., Bornstein R., Pardo J., Martinez A., Diaz-Espada F., Barrios Y. und Ramon y Cajal S. (1999):
An association between viral genes and human oncogenic alterations: the adenovirus E1A induces the Ewing tumor fusion transcript EWS-FLI1.
Nat Med. 5 (9): 1076-9.
132. Sawada Y. und Fujinaga K. (1980):
Mapping of adenovirus 12 mRNA's transcribed from the transforming region.
J Virol. 36 (3): 639-51.
133. Schaeper U., Boyd J. M., Verma S., Uhlmann E., Subramanian T. und Chinnadurai G. (1995):
Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation.
Proc Natl Acad Sci USA. 92 (23): 10467-71.

134. Shaywitz A. J. und Greenberg M. E. (1999):
CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals.
Annu Rev Biochem. 68: 821-61.
135. Shenk T. E. (1996): Adenoviridae: the viruses and their replication.
In: Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M. (Eds.): *Fields Virology*. 3. Ed., S. 2118.
Philadelphia: Lippincott-Raven.
136. Shenk T. und Flint J. (1991):
Transcriptional and transforming activities of the adenovirus E1A proteins.
Adv Cancer Res. 57: 47-85.
137. Shiver J.W. *et al.* (2002):
Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity.
Nature. 415 (6869): 331-5.
138. Smith D. B. und Johnson K. S. (1988):
Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase.
Gene. 67 (1): 31-40.
139. Somasundaram K. und El-Deiry W. S. (1997):
Inhibition of p53-mediated transactivation and cell cycle arrest by E1A through its p300/CBP-interacting region.
Oncogene. 14 (9): 1047-57.
140. Stevenson S. C., Rollence M., White B., Weaver L. und McClelland A. (1995):
Human adenovirus serotypes 3 and 5 bind to two different cellular receptors via the fiber head domain.
J Virol. 69 (5): 2850-7.
141. Strahl B. D., und Allis C. D. (2000):
The language of covalent histone modifications.
Nature. 403 (6765): 41-5.

142. Strobeck M. W., Knudsen K. E., Fribourg A. F., Decristofaro M. F., Weissman B. E, Imbalzano A. N. und Knudsen E. S. (2000):
BRG-1 is required for RB-mediated cell cycle arrest.
Proc Natl Acad Sci USA. 97 (14): 7748-53.
143. Strobeck M. W., DeCristofaro M. F, Banine F, Weissman B. E, Sherman L. S., Knudsen E. S. (2001):
The BRG-1 subunit of the SWI/SNF complex regulates CD44 expression.
J Biol Chem. 276 (12): 9273-8.
144. Strober B. E., Dunaief J. L., Guha S. und Goff S. P. (1996):
Functional interactions between the hBRM/hBRG1 transcriptional activators and the pRB family of proteins.
Mol Cell Biol. 16 (4): 1576-83.
145. Sussenbach J. S. und van der Vliet, P. C. (1984):
The mechanism of adenovirus DNA replication and the characterization of replication proteins.
Curr Top Microbiol Immunol. 109: 53-73.
146. Syntichaki P., Topalidou I. und Thireos G. (2000):
The Gcn5 bromodomain co-ordinates nucleosome remodelling.
Nature. 404 (6776): 414-7.
147. Tan C. K., Castillo C., So A. G. und Downey, K. M. (1986):
An auxiliary protein for DNA polymerase-delta from fetal calf thymus.
J Biol Chem. 261 (26): 12310-6.
148. Travali S., Ku D. H., Rizzo M. G., Ottavio L., Baserga R. und Calabretta B. (1989):
Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen.
J Biol Chem. 264 (13): 7466-72.
149. Utley R. T., Ikeda K., Grant P. A., Côté J., Steger D. J., Eberharter A., John S. und Workman J. L. (1998):
Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes.
Nature. 394 (6692): 498-502.
150. Van der Eb A. J. und Bernards R. (1984):
Transformation and oncogenicity by adenoviruses.
Curr Top Microbiol Immunol. 110: 23-51.

151. Wadell G. (1984):
Molecular epidemiology of human adenoviruses.
Curr Top Microbiol Immunol. 110: 191-220.
152. Watson J. D., Baker T. A., Bell S. P., Gann A., Levine M., Losick R. (1965):
Molecular Biology of the Gene. 6. Ed.
California: The Benjamin/Cummings Publishing Company.
153. White E., Sabbatini P., Debbas M., Wold W. S., Kusher D. I. und Gooding L. R. (1992):
The 19-kilodalton adenovirus E1B transforming protein inhibits programmed cell death
and prevents cytolysis by tumor necrosis factor alpha.
Mol Cell Biol. 12 (6): 2570-80.
154. Wohlfart C. (1988):
Neutralization of adenoviruses: kinetics, stoichiometry, and mechanisms.
J Virol. 62 (7): 2321-8.
155. Wolffe A. P. (1995):
Centromeric chromatin. Histone deviants.
Curr Biol. 5 (5): 452-4.
156. Wu D. Y., Krumm A. und Schubach W. H. (2000):
Promoter-specific targeting of human SWI-SNF complex by Epstein-Barr virus nuclear
protein 2.
J Virol. 74 (19): 8893-903.
157. 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 (6589): 319-24.
158. Yoshimura K., Rosenfeld M. A., Seth P. und Crystal R. G. (1993):
Adenovirus-mediated augmentation of cell transfection with unmodified plasmid vectors.
J Biol Chem. 268 (4): 2300-3.
159. Yudkovsky N., Logie C., Hahn S. und Peterson C. L. (1999):
Recruitment of the SWI/SNF chromatin remodeling complex by transcriptional
activators.
Genes Dev. 13 (18): 2369-74.

160. Zhang S., Mak S. und Branton P. E. (1992):
Adenovirus type 12 early region 1B proteins and metabolism of early viral mRNAs.
Virology. 191 (2): 793-802.
161. Zhang H. S. und Dean D. C. (2001):
Rb-mediated chromatin structure regulation and transcriptional repression.
Oncogene. 20 (24): 3134-8.
162. Zhang H. S., Gavin M., Dahiya A., Postigo A. A., Ma D., Luo R. X., Harbour J. W. und
Dean D. C. (2000):
Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes
containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF.
Cell. 101 (1): 79-89.
163. Zhang Y., Smith C. L., Saha A., Grill S. W., Mihardja S., Smith S. B., Cairns B. R.,
Peterson C. L. und Bustamante C. (2006):
DNA translocation and loop formation mechanism of chromatin remodeling by SWI/SNF
and RSC.
Mol Cell. 24 (4): 559-6

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser (Aqua destillata)
As	Aminosäure
ATF	Activating transcription factor (Familie von Transkriptionsfaktoren)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bp	base pair (Basenpaar)
BRM	Biological Response Modifier, Brahma
BRG-1	BRM-related gene 1, Tumorsuppressor
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserum Albumin)
°C	Grad Celsius
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat, ein Second-Messenger-Molekül
CAT	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
CBF-1	C-promoter-binding factor -1
CBP	CREB-binding protein, Histonacetyltransferase
CoA	Coenzym A
CR	Conserved Regions (konservierte Regionen der E1A-Region der Adenoviren)
CRE	cAMP-Response-Element

CREB	cAMP-response element-binding protein, Transkriptionsfaktor
Da	Dalton (atomare Masseneinheit; 1 Dalton = 1u = $1,66 \times 10^{-24}$ g)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium, standardisiertes Nährmedium für die Zellkultur
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
Ds	doppelsträngig (DNA)
DTT	Dithiothreitol
E2F	Familie von Transkriptionsfaktoren
E.-coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GTF's	Generelle (allgemeine) Transkriptionsfaktoren
h	Stunde
HDAC	Histon-Deacetylase
HAT	Histon-Acetyl-Transferase, Chromatin-remodellierendes Enzym
HMG	high mobility group, Gruppe chromosomaler Proteine
hnRNA	heterogenous nuclear RNA, unvollständig prozessierte eukaryontische Mrna
hsp	heat shock protein; Hitzeschockproteine (nach Molekülmasse unterteilt)
i. d. R.	in der Regel
i. e.	id est, das ist (heißt)

IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kbp	Kilobasenpaare
kDA	Kilo-Dalton
L	Liter
LB	lysogeny broth (Bertani, 2004), Standard- Wachstumsmedium für Bakterien
Luc	Luciferase
M	Molarität (mol/l), Stoffmengenkonzentration
Min	Minute
Mol	Mol (Stoffmenge)
MOPS	3- (N-Morpholino) Propansulfonsäure
NaCl	Natriumchlorid
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NP-40	Nonidet P-40
NRSF	Neuron-restrictive silencer factor, Transkriptionsfaktor
Nr.	Nummer
Nt	Nukleotid
o.	oben
OD	Optische Dichte
p300	Zellulärer Koaktivator, Histonacetyltransferase
p53	Tumorsuppressor, Transkriptionsfaktor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate- Buffered- Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)

PCAF	p300/CBP-assoziiertes Faktor, zellulärer Koaktivator
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PKA	Proteinkinase A
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PERE	PCNA-E1A - Response Element
Ph	<i>potentia Hydrogenii</i> , die Kraft des Wasserstoffs, entspricht dem pH-Wert $\text{pH} = -\log_{10} c [\text{H}^+(\text{mol/l})]$
R	Residue (Aminosäure-Rest)
RB	Retinoblastom-Protein
rel.	relativ(e)
RFX1	Hepatitis B virus enhancer-associated protein, Transkriptionsfaktor
Rpm	Umdrehungen pro Minute, rounds per minute
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Einheit, Sedimentationskoeffizient
s.	siehe
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SNF	sucrose non-fermenting, ATP-abhängiges Chromatin-remodellierendes Enzym
sog.	sogenannt (e)
SRE	Serum response element, DNA-Erkennungssequenz
ssDNA	single stranded DNA, einzelsträngige DNA
SV 40	simian virus (Affenvirus) 40
SWI	yeast mating type switching, ATP-abhängiges Chromatin-remodellierendes Enzym

TBP	TATA-Box Binding Protein, sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
T _m	Schmelztemperatur
TRE	TPA-responsive element
Tris	Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzym-Aktivitätseinheit; 1U = 1mol/min)
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt, elektrische Spannung
vgl.	Vergleiche
VT	Versen-Trypsin
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung g (1 x g = 9,81 x m/s ²)
z. B.	zum Beispiel
>	größer als
<	kleiner als

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

k Kilo	= 10 ⁻³
c Zenti	= 10 ⁻²
m Milli	= 10 ⁻³
μ Mikro	= 10 ⁻⁶
n Nano	= 10 ⁻⁹
p Pico	= 10 ⁻¹²

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung eines Adenovirus-Partikels (nach <i>Akusjärvi, 1993</i>).....	9
Abb. 2: Schematische Darstellung der Organisation des Genoms humanpathogener Adenoviren (nach <i>Watson et al., 1987</i>).....	10
Abb. 3: Struktur der mRNAs (A) und der davon abgeleiteten Proteine (B) der Region E1A des hoch-onkogenen Adenovirus Serotyp 12 (nach <i>Brockmann und Esche, 1995</i>).....	13
Abb. 4: Interaktion zellulärer Faktoren mit dem E1A- Protein (nach <i>Brockmann et al., 2001</i>).	16
Abb. 5: Genstruktur des Proliferating Cell Nuclear Antigen.	17
Abb. 6.: Schematische Darstellung der Organisation des Chromatins (nach <i>Strahl und Allis, 2000</i>)	18
Abb. 7: pGL3 Luciferase Basic-Vektorkarte	28
Abb. 8: Oxidative Decarboxylierung von Luciferin unter Emission von Licht	37
Abb. 9: Prinzip der Gelelektrophorese.....	43
Abb. 10: Prinzip (A) und typisches Programm (B) der Polymerase Chain Reaction (PCR).	45
Abb. 11: Prinzip des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit.	49
Abb. 12: Schematische Darstellung des klonierten Expressionsvektors pGL3-PCNA-Luc.....	55
Abb. 13: Schematische Darstellung des minimalisierten zellulären PCNA- Promotors.....	56
Abb. 14: Schematische Darstellung der Promotorregion um das CRE-Element vom WT und den generierten CRE-Mutanten.	56
Abb. 15: Kontrollsequenzierungen der das CRE-Element enthaltenden Promotorregion des in den Vektor pGL3-Luc klonierten PCNA- Promotors und zweier Promotormutanten.	57
Abb. 16: Kooperation von hBRG1 und hBRM mit dem E1A _{12S} - Protein bei der Aktivierung des PCNA-Promotors.....	58
Abb. 17: Für die PCNA Promotor- Aktivität ist ein intaktes CRE-Motiv erforderlich.....	59
Abb. 18: Inhibition des PCNA- Promotors durch die dominant-negative Mutante A-CREB.	61
Abb. 19: Ein funktionelles aminotermiales Ende des E1A _{12S} - Proteins ist für die Aktivierung der PCNA- Promotoraktivität essentiell.	62
Abb. 20: Die Histondeacetylase HDAC1 reprimiert die hBRG1- vermittelte Aktivierung des PCNA- Promotors.....	63
Abb. 21: Hypothetisches Modell der Aktivierung des PCNA- Promotors durch sequenzspezifische Rekrutierung von hSWI/SNF durch das E1A- Protein im CBP-CREB-PERE Signalweg.	72

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Chemikalien.....	21
Tab. 2: Spezielle Geräte und Zubehör.....	22-23
Tab. 3: Puffer und Lösungen.....	24-25
Tab. 4: Medien für die E.-coli Kultivierung.....	31
Tab. 5: Kits und spezielle Reagenzien	31-32
Tab. 6: Filme, Filter, Membranen und besondere Verbrauchsmaterialien.....	32
Tab.7: Lösungen für den Luciferase- Assay.....	38
Tab. 8: Transferpuffer für die Präparation kompetenter E.-coli-Bakterien.....	40
Tab. 9: Eingesetzte Lösungen für ein Trenn- bzw. Sammelgel	50

Danksagungen

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

Frau Ursula Schmücker möchte ich für ihre hervorragende technische und stets freundliche Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente mit wertvollen Tipps und Tricks für den Laboralltag danken.

Ganz lieber Dank gebührt allen ehemaligen Laborkolleginnen und Laborkollegen für die entspannte Arbeitsatmosphäre und die anregende Kooperation.

Dank gilt auch den in meiner Arbeit erwähnten Wissenschaftlern für die problemlose Bereitstellung verschiedener Plasmide, die für eine erfolgreiche Durchführung meiner Experimente entscheidend waren.

Herzlich danken möchte ich auch Herrn Toni Deenen sowie Herrn Mark Haegermann, die mir nicht nur unermüdlich halfen, alle Tücken des Computers zu überwinden, sondern mir auch stets beide ein verlässlicher und lieber Beistand sind.

Mein besonderer Dank gilt meiner langjährigen Freundin Anika Brandt sowie ihren Eltern Annemarie und Ottokar Brandt für ihre kontinuierliche und verlässliche Unterstützung in allen prekären Situationen, die das Leben bereithält.

Weiterhin danke ich Ralf für seine Liebe, Geduld und unermüdliche Unterstützung.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Inge und Manfred Schwan für ihre immerwährende Unterstützung und Begleitung meines Werdeganges, sowie meinem Patenkind Mia Johanna Wiebke Heuwer mit seinen Eltern Dirk und Regina Heuwer für ihren familiären Beistand und ihre Ermutigung in allen Lebenslagen.

Curriculum Vitae

Name	Alexandra Schwan
Geburtsdatum	06. Oktober 1976
Geburtsort	Essen
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

Schulbildung

1983-1987	Grundschule Stiftsschule, Essen
1987-1996	Gymnasium Maria Wächtler, Essen
1996	Bilinguale Allgemeine Hochschulreife in Englischer Sprache

Hochschulausbildung

10/96-10/98	Vorklinischer Studienabschnitt Humanmedizin; Bochum
10/98-12/02	Klinischer Studienabschnitt Humanmedizin; Essen und Genf
12/02	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Essen
01/03-07/04	Ärztin im Praktikum, Innere Medizin, Swiss Olympic Medical Center, Leukerbad, Schweiz, Direktor: Dr. med. Hans Spring
08/04	Approbation als Ärztin
08/04-05/05	Beginn der Promotion mit der Durchführung des experimentellen Teils als Wissenschaftliche Mitarbeiterin des Instituts für Molekularbiologie am Universitätsklinikum Essen

Assistenzärztin und Wissenschaftliche Mitarbeiterin

06/05-08/06	Universitätsklinikum Bergmannsheil Bochum, Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie, Direktor: Prof. Dr. Schmiegel
10/06-06/08 und 02/09-01/10	Ruhrlandklinik Essen, Lungenkrebszentrum am Westdeutschen Tumorzentrum (WTZ), Abteilung für Thoraxchirurgie (Direktor: Prof. Dr. Stamatis) und Pneumologie (Direktor: Prof. Dr. Teschler)
07/08-12/08	Alfried Krupp Krankenhaus, Standort Essen-Steele, Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Direktor: PD Dr. Joka
seit 02/2010	Charité Comprehensive Cancer Center CCCC, Universitätsmedizin Berlin, Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. P. M. Schlag

Berlin, den 01.03.2010