

Analysen zur Funktion des zellulären
Transkriptionsfaktors Daxx im produktiven
Replikationszyklus von Adenovirus Typ 5

Dissertation zur Erlangung des akademischen Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

am Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg

vorgelegt von
Sabrina Schreiner
aus Deggendorf

April 2010

Für meine Eltern.

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herr Professor Dr. T. DOBNER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. J. HAUBER
Tag der Disputation: 05. März 2010

Hamburg, den 12. Februar 2010



A. Temming

Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGEN.....	V
1 ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 Adenoviren.....	3
2.1.1 Klassifikation	3
2.1.2 Struktur und Genomorganisation humaner Adenoviren	5
2.1.3 Produktiver Infektionszyklus humaner Adenoviren	7
2.1.4 Transformation und Onkogenität humaner Adenoviren	9
2.2 Funktionen des Capsid-Proteins pVI und des Core-Proteins pVII in Adenovirus-infizierten Zellen.....	13
2.3 Funktionen von E1B-55K in Adenovirus-infizierten Zellen	14
2.3.1 E1B-55K/E4orf6-vermittelte Funktionen	14
2.3.2 E1B-55K/E4orf3-vermittelte Funktionen	16
2.3.3 Funktionen von E1B-55K auf transkriptioneller und translationeller Ebene	17
2.3.4 Funktionelle Domänen von E1B-55K	18
2.4 Zusammensetzung und Funktionen der subzellulären PML-NBs	20
2.4.1 Virus-induzierte Modifizierung der PML-NBs	22
2.5 Zielsetzung und Aufgabenstellung.....	26
3 MATERIAL.....	27
3.1 Zellen.....	27
3.1.1 Bakterienstämme	27
3.1.2 Säugerzelllinien	27

INHALTSVERZEICHNIS

3.2	Adenoviren	29
3.3	Nukleinsäuren	30
3.3.1	Oligonukleotide	30
3.3.2	Expressionsvektoren	31
3.3.3	Rekombinante Plasmide	32
3.4	Antikörper	33
3.4.1	Primärantikörper	33
3.4.2	Sekundärantikörper	35
3.5	Kommerzielle Systeme	36
3.6	Enzyme, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	36
3.7	Größen- und Molekulargewichtstandards	36
3.8	Versuchstiere	37
3.9	Software und Datenbanken	37
4	METHODEN	38
4.1	Bakterien	38
4.1.1	Kulturbedingungen und Lagerung	38
4.1.2	Transformation von <i>E. coli</i>	39
4.2	Säugerzellen	40
4.2.1	Kultivierung und Lagerung von etablierten Säugerzellen	40
4.2.2	Gewinnung und Kultivierung primärer Rattennierenzellen	42
4.2.3	Lagerung von Säugerzellen	42
4.2.4	Transfektion/Transduktion von Säugerzellen	43
4.2.5	Ernte von Säugerzellen	46
4.2.6	Transformation primärer Nagerzellen mit Ad-Genprodukten	46
4.2.7	Herstellung stabiler <i>knock-down</i> Zelllinien	47
4.3	Adenoviren	48
4.3.1	Herstellung von Viruspartikeln aus DNA	48
4.3.2	Herstellung und Lagerung hochtitriger Virusstocks	48
4.3.3	Titerbestimmung von Virusstocks	49
4.3.4	Infektion von Säugerzellen mit Adenoviren	50

INHALTSVERZEICHNIS

4.3.5	Bestimmung und Ausbeute an Virusnachkommen	51
4.3.6	Inhibition des zellulären 26S Proteasom	51
4.4	DNA-Klonierungstechniken	52
4.4.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	52
4.4.2	Konzentrationsbestimmung von DNA	53
4.4.3	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	53
4.4.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	54
4.4.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	54
4.4.6	Klonierung von DNA-Fragmenten	56
4.5	RNA-Techniken	57
4.5.1	Vermeidung RNase-induzierten RNA-Abbaus	57
4.5.2	Präparation von RNA aus Säugerzellen	58
4.5.3	Konzentrationsbestimmung von RNA	58
4.5.4	Quantitative <i>Real-time</i> PCR (qRT-PCR)-Analyse zur Ermittlung der mRNA Syntheserate	58
4.6	Protein-Techniken	59
4.6.1	Herstellung von Gesamtzellextrakt aus Säugerzellen	59
4.6.2	Quantitative Bestimmung von Proteinkonzentrationen	59
4.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	60
4.6.4	<i>Western Blot</i> -Analyseverfahren	61
4.6.5	Nachweis von Protein-Protein Interaktionen mittels Immunpräzipitation	63
4.6.6	Immunfluoreszenz-Analysen	64
4.6.7	Lumineszenz-basierte Reporterversuche	66
5	ERGEBNISSE	68
5.1	Analyse der Interaktion des PML-NB-assoziierten Faktors Daxx mit E1B-55K	68
5.1.1	Daxx interagiert mit E1B-55K in Ad5-infizierten Zellen	69
5.1.2	Identifikation eines Daxx-Bindemotivs und Herstellung von E1B-55K Mutationen in diesem Bereich	70
5.2	Analysen zur Rolle von Daxx im produktiven adenoviralen Replikationszyklus	83
5.2.1	Herstellung, Etablierung und Charakterisierung von Daxx-negativen transformierten, humanen Zelllinien	83
5.2.2	Daxx ist ein negativer Regulator der adenoviralen Replikation in transformierten, humanen Zellen	84
5.2.3	Etablierung und Charakterisierung einer Daxx-negativen primären, humanen Zelllinie	86

INHALTSVERZEICHNIS

5.2.4	Daxx ist ein negativer Regulator der adenoviralen Replikation in primären, humanen Hepatozyten	92
5.2.5	Etablierung und Charakterisierung einer Daxx-rekonstituierten Zelllinie	97
5.2.6	Daxx beeinflusst den Abbau von p53	100
5.2.7	Daxx reprimiert den Ad5 E1B-Promotor	102
5.3	E1B-55K-vermittelte Reduktion von Daxx im Verlauf des produktiven Ad5-Replikationszyklus	103
5.3.1	E1B-55K-abhängige, E4orf6-unabhängige Reduktion des Daxx-Proteins	104
5.3.2	E4orf3 und die BC-Box von E4orf6 haben keinen Einfluss auf den Abbau von Daxx	107
5.3.3	Die Inhibition der zellulären 26S Proteasomen verhindert den proteolytischen Abbau von Daxx	108
5.3.4	E1B-55K beeinflusst die Ubiquitylierung von Daxx	110
5.3.5	Der proteolytischer Abbau von Daxx ist Cullin-5-abhängig	112
5.3.6	Die SUMO-Modifikation des E1B-55K-Proteins ist essenziell für den Abbau von Daxx	114
5.3.7	Daxx wird nicht in zelluläre Aggresomen sequestriert	116
5.4	Herstellung der Ad5 Virusmutanten H5pm4197 und H5pm4198 mit Mutationen im Daxx-Bindemotiv von E1B-55K	119
5.4.1	Mutationen im Daxx-Bindemotiv von E1B-55K beeinflussen die subzelluläre Lokalisation	120
5.4.2	Mutationen im Daxx-Bindemotiv von E1B-55K haben keinen Einfluss auf die effiziente Ad5-Replikation	122
5.4.3	Interaktion von E1B-55K mit Daxx in H5pm4197- und H5pm4198-infizierten Zellen	126
5.5	Identifizierung weiterer adenoviraler Interaktionspartner von Daxx im Verlauf des produktiven Ad5-Replikationszyklus	128
5.5.1	Analysen zur Interaktion von Daxx mit den frühen und späten Ad5-Proteinen	128
5.5.2	Interaktion des Core-Proteins pVII mit Daxx in transfizierten H1299-Zellen sowie Ad5-infizierten A549-Zellen	131
5.5.3	Hemmung der Daxx-abhängigen E1B-Promotor Repression durch das virale Core-Protein pVII	134
5.5.4	Daxx unterstützt die nukleäre Akkumulation von pVII	135
6	DISKUSSION	137
6.1	Die E1B-55K/Daxx-Interaktion fördert die vollständige Transformation primärer BRK-Zellen	137
6.2	Daxx ist ein zellulärer Repressor der Ad5-Replikation	142

INHALTSVERZEICHNIS

6.3	Proteasomaler Abbau von Daxx in Ad5-infizierten Zellen	143
6.4	Daxx interagiert mit pVII und L4-100K in Ad5-infizierten Zellen	146
6.5	Daxx: ein zentraler negativer Regulator der produktiven lytischen Infektion von Ad5.....	148
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	151
	VERÖFFENTLICHUNGEN	166
	DANKSAGUNG	168

Abkürzungen

Ad	Adenovirus
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
bid.	bidest
Bp	Basenpaare
BRK	Rattennierenzellen (<i>baby rat kidney cells</i>)
CH	Cystein-Histidin
CR 1, 2, 3	Konservierte Region 1, 2, 3 im Leserahmen von E1A (<i>conserved region</i>)
dapi	4', 6'-Diamidin-2-phenylindol Dihydrochlorid
Daxx	<i>death-domain associated protein</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosid-5-Triphosphate
DTT	Dithiothreitol
E1, E2, E3, E4	frühe Region 1,2,3,4 von Adenovirus (<i>early region</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ETOH _{75%}	75% (v/v) Ethanol in H ₂ O _{bid}
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
ffu	Fluoreszenz-bildende Einheiten (<i>fluorescence forming units</i>)
FKS	fötales Kälberserum
fw	<i>forward</i>
HA	Hämagglutinin Epitop des Influenza-Virus
HDAC	Histondeazetyltransferase
h p.i.	Stunden nach Infektionsbeginn (<i>hours post infection</i>)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horse-radish peroxidase</i>)
IFN	Interferon
IB	Immunblot
Ig	Immunglobulin
IgH	schwere Antikörperkette
IgL	leichte Antikörperkette
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobase
kBp	Kilobasenpaar
K	Kilodalton
Kr <i>bodies</i>	Kremer <i>bodies</i>
L1, 2, 3, 4, 5	späte Region 1, 2, 3, 4 (<i>late region</i>)
LB	Luria Bertani-Medium

ABKÜRZUNGEN

mRNA	<i>messenger RNA</i>
ND10	<i>Nuclear domain 10</i>
NES	nukleäres Exportsignal (<i>nuclear export signal</i>)
moi	Multiplizität der Infektion (<i>multiplicity of infection</i>)
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
orf	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (<i>phosphate buffered saline</i>)
PML	Protein der promyelozytischen Leukämie
PML-NB	<i>PML nuclear body</i>
POD	<i>PML oncogenic domain</i>
Rb	Retinoblastom Tumorsuppressorprotein
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
SCS	SUMO-1 Konjugationsmotiv (<i>SUMO-1 conjugation site</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SIM	SUMO Interaktionsmotiv (<i>SUMO interaction motif</i>)
SUMO-1	<i>small ubiquitin-related modifier-1</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i> (Aktivitätseinheit von Enzymen)
Ubi	Ubiquitin
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumenanteil pro Gesamtvolumen (<i>volume per volume</i>)
Vol.	Volumeneinheit
w/v	Gewichtsanteil pro Gesamtvolumen (<i>weight per volume</i>)
wt	Wildtyp

1 Zusammenfassung

Das 55-kDa Genprodukt der frühen Region 1B (E1B-55K) von Adenovirus Serotyp 5 (Ad5) ist ein multifunktionelles Phosphoprotein, das eine zentrale Rolle im produktiven Infektionszyklus von Ad5 einnimmt. Nach heutigem Wissensstand steuert E1B-55K die virale Replikation in permissiven Wirtszellen auf allen Stufen der Genexpression. Den lytischen Aktivitäten des E1B-Proteins liegen unterschiedliche Wirkmechanismen zugrunde, die teilweise direkt mit seinen transformierenden onkogenen Eigenschaften gekoppelt sind. Im Mittelpunkt steht dabei die Inaktivierung des zellulären Tumorsuppressorproteins p53 auf den Ebenen der Transkription und des Ubiquitin-abhängigen Proteinabbaus. Als weitere Faktoren werden verschiedene Komponenten der PML-NB-Kerndomänen diskutiert, die an E1B-55K binden und eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur (Mre11 und DNA Ligase IV) und der Transkription (Daxx, PML und Sp100) spielen.

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit Untersuchungen zur Rolle der PML-NB-Komponente Daxx im Ad5-vermittelten Transformationsvorgang primärer Säugerkzellen und im produktiven Infektionszyklus in permissiven Wirtszellen. Primäres Ziel war es, die Rolle der E1B-55K/Daxx-Interaktion in beiden Systemen mit Hilfe genetischer und biochemischer Analyseverfahren zu untersuchen. Dadurch sollte unter anderem die Bedeutung von Daxx bzw. der PML-NB-Kerndomänen in der Steuerung der viralen Onkogenese und im Ad5-Replikationszyklus aufgeklärt werden.

Durch klassische Transformationsexperimente auf der Basis primärer Rattenepithelzellen (pBRK) konnte gezeigt werden, dass die Bindung von E1B-55K an Daxx ein wichtiges Ereignis im Ad5-induzierten Transformationsvorgang in diesen Zellen darstellt. Interessanterweise wird dabei die Repression von p53 durch Mutationen in den

Daxx-Bindemotiven nicht beeinträchtigt. Dieses Ergebnis bestätigt erstmals die Hypothese, dass das onkogene Potenzial von E1B-55K auch p53-unabhängige Funktionen umfasst, die über die Wechselwirkung und Inaktivierung von Daxx gesteuert werden. Außerdem unterstützen sie die Annahme, dass der Daxx-Interaktionspartner PML und möglicherweise andere PML-NB-Komponenten wichtige Zielproteine darstellen, über die E1B-55K zur vollständigen Zelltransformation beiträgt.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde im zweiten Teil dieser Arbeit die Rolle der E1B-55K/Daxx-Interaktion im viralen Lebenszyklus untersucht. Mit Hilfe von Daxx-depletieren Tumorzelllinien (A549 und H1299) und pseudo-primären (HepaRG) *knock-down* Linien konnte gezeigt werden, dass Daxx ein negativer Regulator der Ad5-Replikation ist, der vermutlich auf transkriptioneller Ebene die Expression früher viraler Gene reprimiert. In diesem Zusammenhang gelang auch der Nachweis, dass Daxx im zeitlichen Verlauf der lytischen Infektion dem proteasomalen Abbau über einen E1B-abhängigen Mechanismus zugeführt wird. Auf molekularer Ebene erfolgt die Reduktion von Daxx durch Cullin-5-gesteuerte Ubiquitylierung an 26S-Proteasomen. Als eine weitere, wichtige Komponente des Abbaus konnte die SUMO-Konjugation des E1B-Proteins identifiziert werden. Insgesamt weisen diese Ergebnisse erstmalig auf eine E3-Ubiquitinligaseaktivität des E1B-Proteins hin, die vermutlich im Verbund mit anderen viralen Faktoren die Funktionen von Daxx in virusinfizierten Zellen moduliert. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um die viralen Faktoren E2A, L4-100K, pVI und pVII, das vermutlich zusammen mit Daxx den aktiven Transport des Ad5-Chromosoms in den Zellkern fördert.

2 Einleitung

2.1 Adenoviren

2.1.1 Klassifikation

Adenoviren wurden in den letzten 55 Jahren einerseits sehr intensiv als Modellsystem zur Aufklärung der Wechselwirkungen zwischen Virus und Wirtszelle erforscht, andererseits aber auch als Vektor in der Gentherapie genutzt. Erstmals wurden Adenoviren 1954 aus adenoidem Gewebe und dem Rachensekret respiratorisch erkrankter Personen isoliert (Hilleman *et al.*, 1954; Rowe *et al.*, 1953). Diese Isolate wurden zunächst nach ihren Krankheitsbildern, wie *acute respiratory disease* (ARD), *adenoid-pharyngeal-conjunctival* (APC), *respiratory illness* (RI) oder einfach *adenoid degeneration* (AD) bezeichnet. Seit 1956 fasste man sie aufgrund gemeinsamer Merkmale und Eigenschaften (Huebner *et al.*, 1954) zur Gruppe der Adenoviren zusammen (Enders *et al.*, 1956).

Die Familie der *Adenoviridae*, deren Mitglieder nur Vertebraten infizieren können (Benkö *et al.*, 1999), umfasst derzeit über 100 serologisch unterscheidbare Virusserotypen (Abb. 1). Anfangs wurde die Familie in zwei Gattungen unterteilt, die Adenoviren der Säugetiere (*Mastadenoviren*) und der Vögel (*Aviadenoviren*). Aufgrund des breiten Wirtsspektrums von Adenoviren entschied man sich aber drei weitere Gattungen einzuführen: *Atadenoviren* der Reptilien (Benkö *et al.*, 1998), deren Name auf den erhöhten Adenin- und Thymidin-Gehalt der viralen DNA zurückzuführen ist (Benkö *et al.*, 1998), *Siadenoviren* der Amphibien (Davison *et al.*, 1993) und die erst kürzlich isolierten *Ichtadenoviren* der Fische (Benko *et al.*, 2002). Humane Adenoviren unterscheidet man bis heute hinsichtlich ihrer Eigenschaften zur Hämagglutination mit bestimmten humanen Seren (Bailey *et al.*, 1994; Wadell, 1984), dem onkogenen Potenzial in immunsupprimierten Versuchstieren sowie der adenoviralen DNA Sequenz.

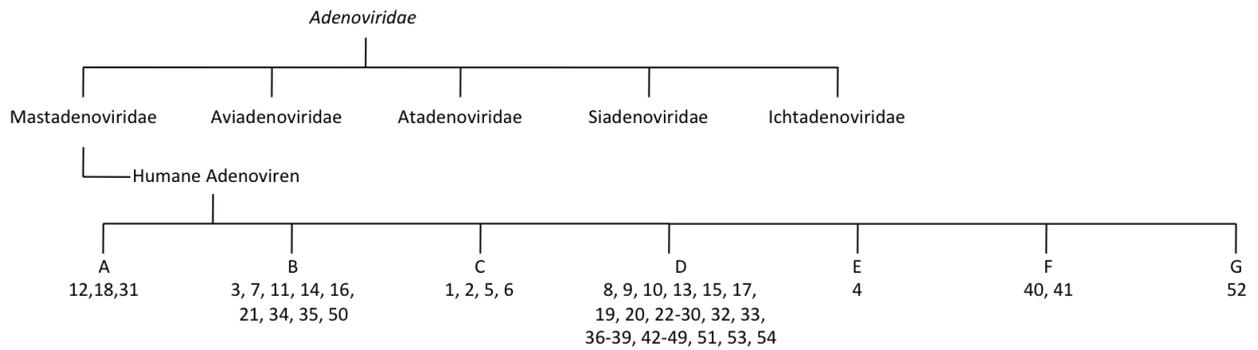


Abb. 1 Klassifikation humaner Adenoviren

Schematische Darstellung der Familie der *Adenoviridae*. Die Serotypen 1 bis 54 humaner Adenoviren sind in die Subgruppen A bis G eingeteilt (Davison *et al.*, 2003; Ad53, Ad54: basierend auf Einordnung durch ICTV/international committee on taxonomy of viruses, August 2009).

Bis heute sind 54 verschiedene humane Serotypen der Mastadenoviren bekannt, welche in sieben Subgruppen A-G unterteilt werden (Davison *et al.*, 2003).

Humane Adenoviren sind weltweit mit hoher Prävalenz verbreitet, verursachen sowohl lytische als auch persistierende Infektionen und sind mit einer Vielzahl klinischer Symptome assoziiert. Die Krankheitsbilder umfassen dabei okuläre, respiratorische und gastroenterale Erkrankungen wie Appendizitis (Subgruppe A, E), Gastroenteritis (Subgruppe G), Keratokonjunktivitis (Subgruppe A,D,E), Pharyngitis (Subgruppe A,E), Pneumonie (Subgruppe A,E), persistierende Harnwegsinfektionen (Subgruppe B), Zystitis (Subgruppe A,B,E), Hepatitis und Meningoenzephalitis (Subgruppe B; Russel, 2000). Interessanterweise konnte kürzlich adenovirale DNA der Subgruppen A und D in humanen, pädiatrischen Gehirntumoren nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang kann die adenovirale Pathogenese erstmals neben Tumoren in Nagern mit humanen Tumoren in Verbindung gebracht werden (Kosulin *et al.*, 2007). In seltenen Fällen können Ad-Infektionen vor allem nach Knochenmarkstransplantationen (Abe *et al.*, 2003) und bei immunsupprimierten Personen zum Tode führen (Horwitz, 1996).

2.1.2 Struktur und Genomorganisation humaner Adenoviren

Viren aus der Familie der *Adenoviridae* bestehen aus einem 80–110 nm großen ikosaedrischen Proteincapsid ohne Membranhülle und enthalten ein 26–45 kBp langes doppelsträngiges lineares DNA-Genom (Shenk, 2001). Das adenovirale Genom besitzt mehrere invertierte terminale Sequenzwiederholungen (ITR; *inverted terminal repeats*) zwischen 36-200 Bp. Das 5' terminale Ende ist mit dem viralen Terminalen Protein (TP) assoziiert, welches zur Initiation der viralen Replikation benötigt wird (Davison *et al.*, 2003).

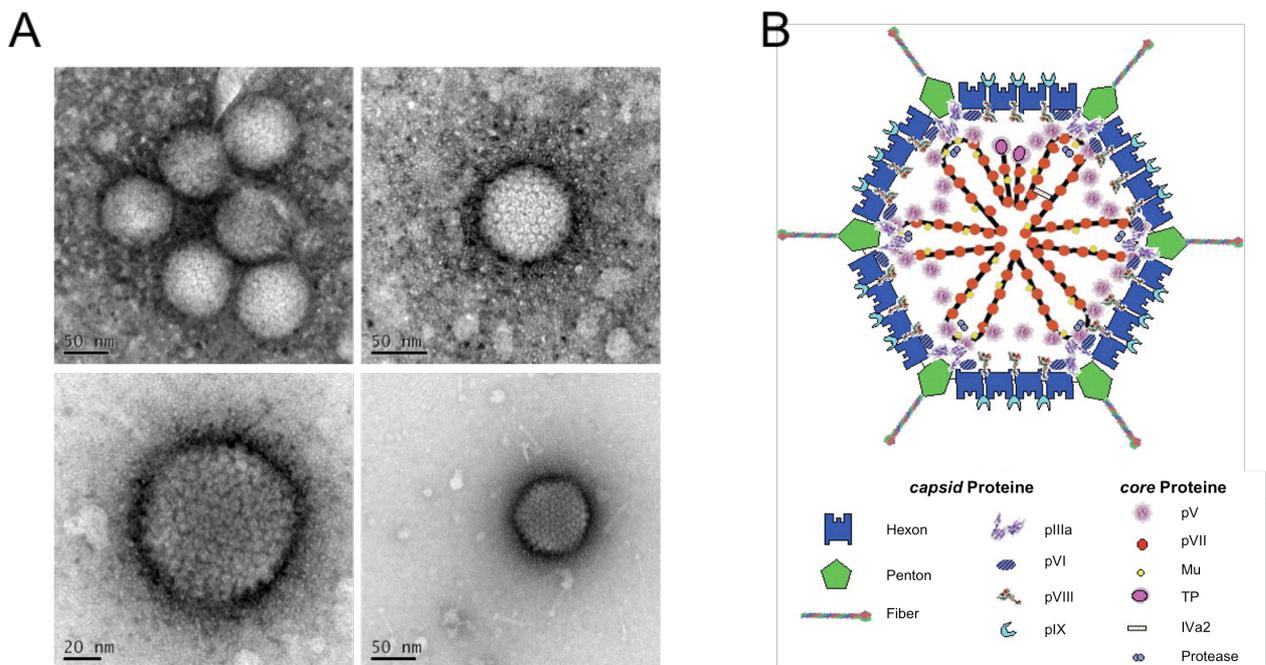


Abb. 2 Schematische Darstellung eines Adenovirus

A. Die Abbildung zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von Ad5 Viruspartikeln. Zu erkennen ist das ikosaedrische Capsid mit den Hexonproteinen (Forschungsgruppe Elektronenmikroskopie und Mikrotechnologie, Heinrich-Pette Institut Hamburg). B. Die Darstellung zeigt einen schematischen Querschnitt durch ein Adenovirus basierend auf cryomikroskopischen Aufnahmen. Die genaue Anordnung der Core-Proteine um die virale DNA kann zum derzeitigen Stand der Wissenschaft nur vermutet werden (Russell, 2009).

Das virale Capsid ist aus 240 trimeren Hexonen und 12 Pentonen aufgebaut (Abb. 2; Stewart *et al.*, 1993). Die eckständigen Pentone sind nicht-kovalent mit Fiberproteinen verknüpft und bilden ein Charakteristikum der Adenoviruscapside, die antennenartigen Fortsätze (*spikes*). Diese ermöglichen die Adsorption des Virus an den Rezeptor der Wirtszelle. Der bevorzugte Rezeptor von Subgruppe C Adenoviren ist identisch mit dem für Coxsackie B Viren und wurde daher als Coxsackie/Adenovirus Rezeptor (CAR) bezeichnet (Bergelson *et al.*, 1997). Bei den sogenannten adenoviralen Core-Proteinen unterscheidet man die mit dem Capsid assoziierten, wie pIIIa, pVI, pVIII und pIX (Vellinga *et al.*, 2005) sowie die mit dem viralen Genom assoziierten Proteine pV, pVII, Mu, IVa2 und TP (Russell, 2009; Russell *et al.*, 2003). Zur Aufnahme des Virus in die Zellen durch Rezeptor-vermittelte Endozytose spielt auch das Pentonbasisprotein eine wichtige Rolle, weil es den Kontakt zu den Integrinen auf der Zelloberfläche herstellt (Mathias *et al.*, 1994; Wickham *et al.*, 1994; Wickham *et al.*, 1993). Zu den bis heute am ausführlichsten untersuchten Adenoviren gehören die nah verwandten Serotypen 2 und 5 (Ad2 und Ad5) der Subgruppe C.

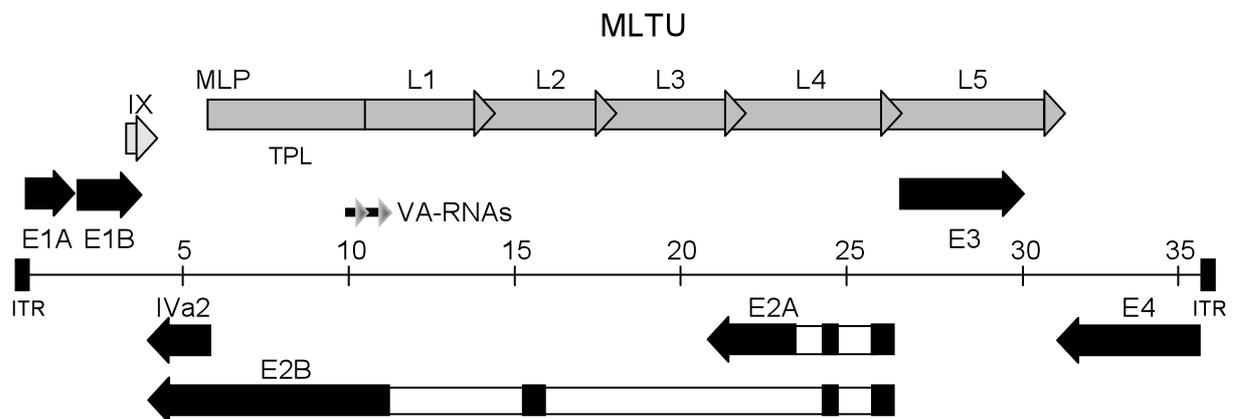


Abb. 3 Die Genomorganisation von Adenovirus Serotyp 5

Dargestellt ist die Lage der frühen Gene (E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, pIX und IVa2) und der späten Transkriptionseinheit (MLTU), wobei die Pfeilrichtung die Transkriptionsrichtung auf den beiden kodierenden DNA-Strängen des viralen Genoms angibt. Die späten Gene (L1 bis L5) werden erst nach dem Einsetzen der viralen DNA-Replikation von einem gemeinsamen Promotor (MLP) aus transkribiert und kodieren hauptsächlich für Strukturproteine des Virions. Die frühen viralen Transkriptionseinheiten sind bereits vor Beginn der DNA-Synthese aktiv und besitzen regulatorische Funktionen in Bezug auf DNA-Replikation (E2), Modulation des Immunsystems (E3) sowie Transkription, RNA-Prozessierung und Zellzyklus-Kontrolle (E1A, E1B und E4). MLTU: *major late transcription unit*; MLP: *major late promoter*; TPL: *tripartite leader*; VA RNAs: *virus-associated RNAs*; ITR: *inverted terminal repeat*).

Das Genom von Ad5 enthält neun Transkriptionseinheiten, die für etwa 40 verschiedene regulatorische und strukturelle Proteine sowie zwei RNAs (*virus-associated RNAs*, VA RNAs) kodieren (Abb. 3). Sequenzvergleiche mit anderen Serotypen zeigen, dass alle humanen Adenoviren eine ähnliche Genomorganisation besitzen und einen konservierten Satz an Genprodukten exprimieren (Davison *et al.*, 2003; Shenk, 2001).

2.1.3 Produktiver Infektionszyklus humaner Adenoviren

Bevorzugte Zielzellen humaner Adenoviren sind postmitotisch ruhende, terminal differenzierte Epithelzellen des Hals-, Nasen- und Rachenraumes, der Lunge und des Verdauungstraktes. In Gewebekultur können Adenoviren in verschiedenen Tumorzelllinien und primären Zellen vermehrt werden. Während sie in vielen humanen Zellen einen produktiven lytischen Vermehrungszyklus durchlaufen, resultieren Infektionen von Zellen tierischen Ursprungs meist in einem abortiven Infektionsverlauf (Liebermann *et al.*, 1996; Shenk, 2001). Auf der Grundlage neuer Arbeiten, wird seit kurzem auch die Möglichkeit einer latenten Adenovirusinfektion diskutiert (Garnett *et al.*, 2009; Gustafsson *et al.*, 2007; Kosulin *et al.*, 2007).

Der adenovirale Infektionszyklus zeigt eine charakteristische zeitliche Abfolge viraler Genexpression, um die Synthese viraler DNA und Strukturproteinen gewährleisten zu können. Der produktive Infektionszyklus wird in eine frühe und eine späte Phase unterteilt, die durch das Einsetzen der viralen DNA-Synthese getrennt sind. In der frühen Phase erfolgt nach Adsorption, Penetration und Kernimport des viralen DNA/Core-Protein-Komplexes die Transkription und Translation früherer Gene. In einer zeitlich koordinierten Reihenfolge und unter Beteiligung der zellulären RNA Polymerase II werden über 20 regulatorische Proteine der frühen Transkriptionseinheiten E1, E2, E3 und E4 exprimiert. Das Ziel der entsprechenden Genprodukte ist die Schaffung optimaler Bedingungen für die späte Phase der Infektion. Vor allem der Eintritt der G₀-Zellen in die S-Phase und die Zellzyklusprogression durch die E1A- und E1B-Proteine ist für die virale Replikation essenziell, da den Viren nur in sich

teilenden Zellen ein genügend großes Repertoire an Molekül-Bausteinen zur Verfügung steht.

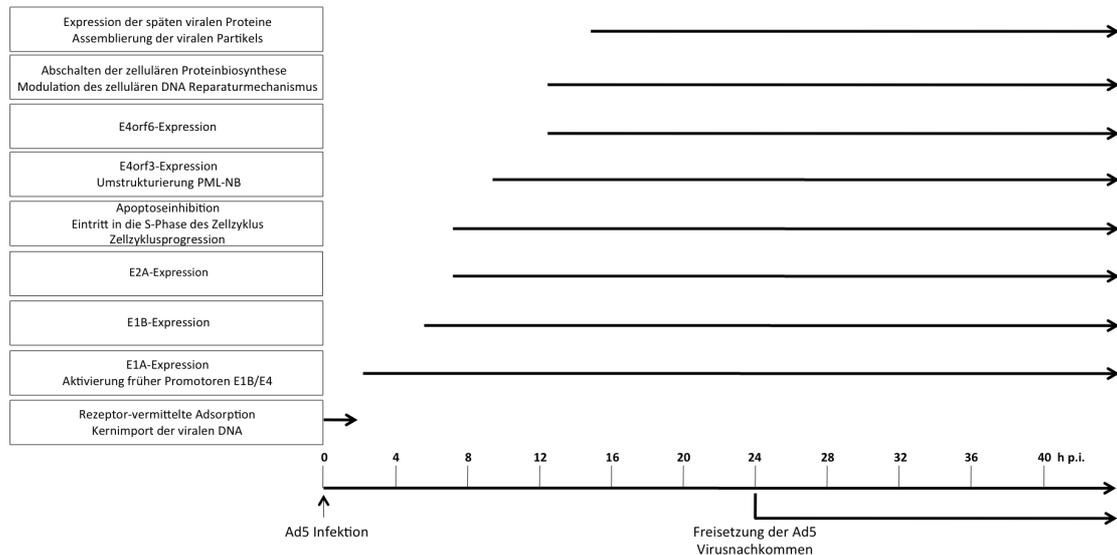


Abb. 4 Ad5 Lebenszyklus im zeitlichen Verlauf

Die Abbildung zeigt eine Übersicht der unterschiedlichen Phasen des viralen Infektionszyklus vom Eindringen des Viruspartikels in die Wirtszelle bis zur Freisetzung der Nachkommenviren. Der untere Pfeil gibt den zeitlichen Verlauf an. Jeder Abschnitt in der Ad5-Infektion ist mit einem weiteren Pfeil gekennzeichnet und gibt dessen Beginn auf der Zeitskala an (König *et al.*, 1999).

Die Fähigkeit der E1A- und E1B-Polypeptide zelluläre Mechanismen der Wachstumskontrolle zu modulieren, bildet auch die molekulare Grundlage ihres transformierenden Potenzials. Die frühen E1A-Proteine (E1A-12S und E1A-13S) sind nach dem Eintritt der viralen DNA in den Zellkern der Wirtszelle die ersten Genprodukte, welche aus alternativ gespleißter mRNA transkribiert werden (Avvakumov *et al.*, 2002; Moran *et al.*, 1986; Schaeper *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass eine konservierte Sequenz beider Proteine mit dem zellulären Rb-Protein interagiert und dadurch die E2F-abhängige Transkription der Wirtszelle verhindert (Dyson *et al.*, 1993; Moran, 1993; Nevins, 1992). Diese Interaktion ist ausschlaggebend für die Fähigkeit zur Transformation in Kooperation mit den viralen E1B Proteinen (E1B-19K, E1B-55K) oder einem aktivierten ras Onkogen (Howe *et al.*, 1990; Zerler *et al.*, 1986). Die frühe Transkriptionseinheit E2 kodiert für Proteine, die eine wichtige Funktion in der Replikation viraler DNA haben. Dazu gehören die viruseigene DNA-Polymerase, das DNA-bindende Protein (E2A) und TP, das kovalent mit den 5'-Enden des Virusgenoms verknüpft ist (Shenk, 2001). Die Proteine der E3-Region besitzen hauptsächlich

modulatorische Funktionen, die das Erkennen und vorzeitige Eliminieren von virusinfizierten Zellen durch das Immunsystem des Wirtsorganismus verhindern (Burgert *et al.*, 2000; Gooding *et al.*, 1990). Die E4-Region kodiert für mindestens sechs verschiedene Polypeptide, die durch alternatives Spleißen aus dem primären E4-Transkript entstehen und nach Anordnung des jeweiligen offenen Leserahmens als E4orf1, E4orf2, E4orf3, E4orf4, E4orf6 und E4orf6/7 bezeichnet werden. Ein weiteres Protein könnte E4orf3/4 darstellen, das jedoch bisher nicht in infizierten Zellen nachgewiesen werden konnte. Die E4-Proteine besitzen vielfältige Funktionen, die für eine effiziente virale Replikation benötigt werden (Täuber *et al.*, 2001a).

In der späten Phase des lytischen Infektionszyklus beginnt die Transkription der späten Transkriptionseinheit MLTU (*major late transcription unit*) vom Promotor MLP (*major late promoter*). Aus der 29 kb großen Vorläufer-mRNA MLTU entstehen durch differenzielles Spleißen schließlich fünf Gruppen verschieden langer mRNAs (L1 bis L5), die hauptsächlich für Strukturproteine des ikosaedrischen Capsids darunter Fiber und Hexon kodieren. Diese mRNAs besitzen alle einen gemeinsamen 5'-nicht-kodierenden Bereich, der als *tripartite leader* (TPL) bezeichnet wird. Wesentlicher Bestandteil der späten Phase ist das Abschalten der zellulären Proteinbiosynthese (*host shut-off*), während virale mRNAs weiter translatiert werden. Weitere Veränderungen in der späten Phase sind die Reorganisation des Zellkerns (Puvion-Dutilleul *et al.*, 1995a), unter anderem hervorgerufen durch die massive Akkumulation viraler DNA sowie die gezielte Umstrukturierung des Zytoskeletts der Wirtszelle (Defer *et al.*, 1990). Nach etwa 24 h am Ende des produktiven Replikationszyklus in Gewebekultur, wird die Wirtszelle lysiert und je nach Serotyp bis zu 10 000 Viruspartikel freigesetzt (Abb. 4; Liebermann *et al.*, 1996; Shenk, 2001).

2.1.4 Transformation und Onkogenität humaner Adenoviren

Adenoviren stellten die ersten humanpathogenen Viren mit kanzerogenen Eigenschaften im Tiermodell dar. Nach subkutaner Injektion von Adenovirus Serotyp 12 (Ad12) in neugeborene Hamster kam es zur Bildung undifferenzierter Sarkome

(Trentin *et al.*, 1962). Ähnliche Beobachtungen mit anderen Nagetieren und die Erkenntnis, dass nicht alle adenoviralen Serotypen tumorigen sind, führte wie bereits erwähnt zur Klassifizierung der 54 heute bekannten humanen Serotypen in die sieben Subgruppen (A bis G; Abb. 5).

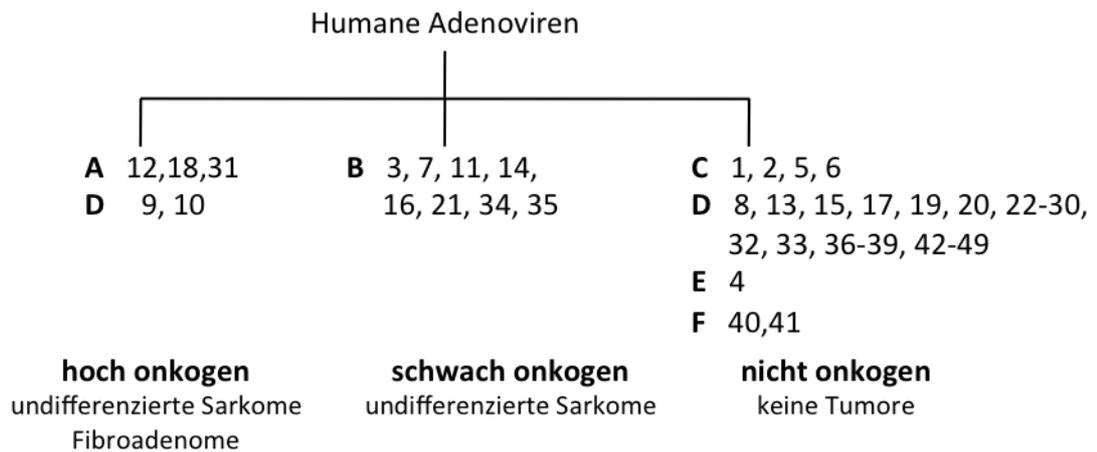


Abb. 5 Onkogenität der humanen Ad-Serotypen

Die Abbildung zeigt eine Übersicht der Onkogenität der unterschiedlichen, bereits auf diese Eigenschaft untersuchten Adenovirus Subtypen sowie eine Übersicht über die Art der induzierten Tumore. Ad50, Ad51, Ad52, Ad53 und Ad54 können noch nicht in dieses Schema eingeordnet werden.

Virustypen der Subgruppe A sind hoch onkogen, während die Vertreter der Subgruppe B schwach onkogen sind und nur ineffizient und nach langer Inkubationszeit Tumoren in Nagetieren induzieren (Abb. 5). Viren der Subgruppe C bis F werden heute allgemein als nicht onkogen eingestuft. Eine Ausnahme bilden jedoch die Serotypen 9 und 10 der Subgruppe D, die mammarkarzinom-ähnliche Tumoren in den Brustdrüsen weiblicher Ratten induzieren (Ankerst *et al.*, 1989; Javier *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 2001). Frühere Arbeiten zeigten, dass humane Adenoviren primäre Zellen in Gewebekultur transformieren können (Nevins *et al.*, 1996). Diese transformierten Zellen, die nicht mehr der Kontaktinhibition und der Verankerungsabhängigkeit unterliegen, wachsen als dichte, mehrschichtige Zellhaufen (*Foci*). Es können jedoch nicht alle dieser transformierten Zelllinien nach Inokulation in Nagetiere, Tumoren erzeugen. Ihre Tumorigenität variiert also in Abhängigkeit vom Virustyp und dem Immunstatus des Versuchstiers (Abb. 5; Graham, 1984; Shenk, 2001;

Williams *et al.*, 1995). In diesem Zusammenhang konnte nachgewiesen werden, dass Zellen, die mit Subtyp A Viren transformiert wurden, in immunkompetenten Nagetieren ein Tumorwachstum erzeugen, während Zellen, die mit Subtyp C transformiert wurden, dasselbe tumorigene Potenzial nur in immunsupprimierten (thymusdefizienten) Ratten aufweisen. Dies zeigt, dass die Tumorigenität von Adenovirus-transformierten Zellen hauptsächlich von den thymusabhängigen CTL-Komponenten des Immunsystems der Wirtstiere beeinflusst wird (Bernards *et al.*, 1982; Cook *et al.*, 1987; Raska *et al.*, 1982). Bis heute konnten nur wenige humane Zellen erfolgreich mit Ad12- oder Ad5-DNA-Fragmenten transformiert werden. Bei diesen Zellen handelt es sich im Allgemeinen um embryonale Zellen, wie humane embryonale Nierenzellen HEK (human embryonal kidney cells; Graham *et al.*, 1977; Shaw *et al.*, 2002; Whittaker *et al.*, 1984), humane embryonale Lungenzellen HEL (human embryonal lung cells; van den Heuvel *et al.*, 1992), humane embryonale Retinoblasten HER (human embryonal retinoblasts; Fallaux *et al.*, 1998; Fallaux *et al.*, 1996; Gallimore *et al.*, 1986) und humane Amniozyten (Schiedner *et al.*, 2000). Die Ergebnisse zahlreicher Untersuchungen zeigten bis jetzt, dass sich die meisten Adenovirus-induzierten Tumoren, Tumorzelllinien und transformierten Zellklone durch die Persistenz der viralen DNA über chromosomale Integration und die Expression virusspezifischer Antigene auszeichnen. Dementsprechend folgt die adenovirale Transformation meist dem klassischen Konzept der viralen Onkogenese, welche auf der Persistenz der viralen Gene in transformierten Zellen beruht (Graham, 1984). Allerdings wurde in Einzelfällen beobachtet, dass die ständige Anwesenheit und Expression adenoviraler Sequenzen nicht für die Aufrechterhaltung des onkogenen Phänotyps verantwortlich ist (Kuhlmann *et al.*, 1982; Paraskeva *et al.*, 1982; Paraskeva *et al.*, 1980; Pfeffer *et al.*, 1999). Während die Mehrzahl der durch Ad9 und Ad12 entstandenen Tumorzellen eine oder mehrere Kopien des viralen Genoms enthalten (Brusca *et al.*, 1984; Graham, 1984; Javier *et al.*, 1991), findet man in den meisten Ad2 oder Ad5 transformierten Nagetierzellen nur Teile des viralen Genoms (Graham, 1984). Ebenso können in den meisten vollständig transformierten Zelllinien, die nach Transfektion rekombinanter Plasmide etabliert wurden, kodierende Sequenzen für die E1A- und E1B-Onkogene in integrierter Form nachgewiesen werden. Aufgrund dieser

Tatsache wurde das onkogene Potenzial von Adenoviren hauptsächlich der frühen E1-Transkriptionseinheit zugeordnet (Abb. 3). Diese Region kodiert für die Genprodukte der E1A- und E1B-Transkriptionseinheiten und ist für eine vollständige morphologische Transformation notwendig und ausreichend (Bernards *et al.*, 1984; Graham, 1984; Shenk, 2001). Die E1A-Genprodukte allein führen zu einer Immortalisierung oder partiellen Transformation von Zellen (Houweling *et al.*, 1980). Erst durch die zusätzliche Expression der E1B-Proteine werden die Zellen vollständig transformiert. Beide E1A-Proteine sind in der Lage Zellen zu immortalisieren, die Zellzyklusbarrieren aufzuheben und zusammen mit anderen viralen oder zellulären Onkogenen, Zellen zu transformieren. Diese Funktionen werden durch zahlreiche Interaktionen mit wachstumshemmenden und regulatorischen Proteinen vermittelt (Russell, 2000). Dabei sind die E1A-Proteine in der Lage sowohl transformierende Eigenschaften und antiproliferative Mechanismen zu induzieren als auch durch Induktion des zellulären Tumorsuppressors p53 Apoptose einzuleiten (Chinnadurai, 1998; White, 1995; White, 1998). Jedoch ist E1A auch in der Lage p53-unabhängige Apoptosewege zu aktivieren (Marcellus *et al.*, 1996; Teodoro *et al.*, 1995). Beide E1B-Proteine (E1B-19K, E1B-55K) transformieren primäre Nagerzellen in Kooperation mit E1A vollständig, wobei sie unabhängig voneinander, jedoch additiv wirken (Gallimore *et al.*, 1985; McLorie *et al.*, 1991). Wichtig dabei ist die Fähigkeit beider E1B-Proteine, auf unterschiedlichen Wegen den E1A-induzierten Zelltod zu blockieren (Chinnadurai, 1998; White, 1998). Das E1B-19K ist dem zellulären Proto-Onkogen Bcl-2 funktionell ähnlich und interagiert mit den Apoptoseregulatoren Bax und CED4 (White, 1996). Obwohl E1B-19K nicht direkt mit p53 interagiert, kann es über einen noch unbekanntem Mechanismus die p53-induzierte Transrepression aufheben, die über den C-Terminus des Tumorsuppressorproteins vermittelt wird (White, 1996). Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass sowohl E4orf3, als auch E4orf6 ein transformierendes und onkogenes Potenzial zeigen und die Adenovirusvermittelte Transformation fördern (Nevels, 1999; Täuber *et al.*, 2001a). In diesem speziellen Fall scheint allerdings die Anwesenheit der viralen Onkogene für die Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps nicht notwendig zu sein, was auf einen *Hit&Run*-Mechanismus hindeutet (Nevels *et al.*, 2001).

2.2 Funktionen des Capsid-Proteins pVI und des Core-Proteins pVII in Adenovirus-infizierten Zellen

Das DNA-assoziierte Core-Protein pVII ist ein hoch-konserviertes Protein in allen bekannten Adenoviren und spielt beim nukleären Import des viralen Genoms in den Zellkern eine wesentliche Rolle. Dieser virale Faktor ist aktiv am Importin-vermittelten Eintritt des viralen Genoms in den Zellkern beteiligt und bleibt während des gesamten Vorgangs an die transportierte DNA komplexiert. Anschließend dissoziiert das Core-Protein vom Ad-Genom ab und leitet damit die virale DNA-Synthese ein (Lee *et al.*, 2003). Durch die Ad-kodierte Protease werden vom Vorläuferprotein (174 AS) 24 AS des N-Terminus abgespalten. Weiterhin besitzt pVII Arginin- und Lysin-reiche AS-Abfolgen, um die sequenzunspezifische Interaktion des Core-Proteins mit dem Phosphatgerüst von 90-150 Bp der viralen DNA zu vermitteln. Frühere Arbeiten zeigten außerdem eine starke Homologie von pVII zum N-terminalen, transkriptionsregulierenden Abschnitt des humanen Histon 3 (Lee *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zum Core-Protein pVII hat das Capsid-Protein pVI zwei sehr unterschiedliche Funktionen im Verlauf des viralen Lebenszyklus. Es ist bereits bekannt, dass pVI das virale Genom-assoziierte Core mit dem Capsid verbindet, und deswegen für eine hohe Stabilität des gesamten Viruspartikels sorgt. Immunfluoreszenzanalysen konnten zeigen, dass pVI im Zellkern und im Zytoplasma lokalisiert. Dies ist die Grundlage für pVI als viruseigenes Transportmolekül für den Importin-abhängigen nukleären Transport des trimeren viralen Hexon Proteins. Hexon besitzt kein nukleäres Importsignal und kann nur in Anwesenheit von pVI nukleozytoplasmatisch pendeln. Neueste Beobachtungen zeigten außerdem, dass pVI analog zu pVII und weiteren Strukturproteinen im Laufe des Replikationszyklus proteolytisch gespalten wird und dadurch die Sequenzmotive des NLS sowie des NES verliert. Somit kommt es zu einer funktionellen Transition von einem nukleozytoplasma-

tischen Transporter zu einem stabilisierenden Strukturprotein während der Assemblierung der Nachkommenviren (Wodrich *et al.*, 2003). In neueren Arbeiten konnte weiterhin festgestellt werden, dass pVI ein pH-unabhängiger lytischer Faktor zur Freisetzung des Genoms aus dem Endosom ist und das Eindringen des viralen Genoms in den Zellkern der Wirtszelle ermöglicht (Wiethoff *et al.*, 2005).

2.3 Funktionen von E1B-55K in Adenovirus-infizierten Zellen

Das Ad5 E1B-55K-Protein der frühen Transkriptionseinheit 1B ist ein 496 AS großes multifunktionelles Phosphoprotein mit einem Molekulargewicht von 55 kDa. Während die Funktionen der meisten regulatorischen Genprodukte auf eine bestimmte Phase im lytischen Infektionszyklus beschränkt sind, ist E1B-55K in der frühen als auch in der späten Phase der produktiven Virusinfektion von entscheidender Bedeutung. Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre ergaben, dass E1B-55K modulatorische Funktionen auf transkriptioneller, posttranskriptioneller, translationaler und posttranslationaler Ebene besitzt.

2.3.1 E1B-55K/E4orf6-vermittelte Funktionen

Grundlegend für zahlreiche frühe sowie späte Funktionen von E1B-55K ist die Interaktion mit dem viralen E4orf6-Protein, einem frühen Genprodukt der E4-Region. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von E4orf6 für die nukleäre Lokalisation von E1B-55K essenziell ist (Dobbelstein *et al.*, 1997; Goodrum *et al.*, 1996; Ornelles *et al.*, 1991). Neueste Arbeiten postulieren außerdem eine Rolle des zellulären Faktors RUNX (*runt related transcription factor*) bei der Umlokalisierung von E1B-55K durch E4orf6 (Marshall *et al.*, 2008). Weiterhin zeigten zahlreiche frühere Arbeiten, dass E1B-55K mit E4orf6 sowie den zellulären Komponenten Cullin-5, Rbx1/RCO1/Hrt1, Elongin B und C eine SCF-ähnliche E3-Ubiquitinligase ausbildet, deren Anwesenheit für den viralen Lebenszyklus in vielen Bereichen nötig ist. Dabei stellt E4orf6 die Verbindung zum E3-Ligasekomplex her, während E1B-55K vermutlich als Substratlieferant dient (Blanchette *et al.*, 2004; Harada *et al.*, 2002;

Querido *et al.*, 2001). Der E1B-55K/E4orf6-Proteinkomplex reguliert die virale Genexpression auf posttranslationaler Ebene, indem er den proteolytischen Ubiquitin-abhängigen Abbau von p53, Mre11 und weiteren zellulären Substraten veranlasst (Baker *et al.*, 2007; Blanchette *et al.*, 2004; Dallaire *et al.*, 2009; Harada *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997a; Querido *et al.*, 1997a; Querido *et al.*, 1997b; Steegenga *et al.*, 1998; Stracker *et al.*, 2002). Der Abbau des Tumorsuppressorproteins p53 ist für den viralen Infektionszyklus nötig, da die E1A-Genprodukte die Fähigkeit besitzen Apoptose einzuleiten indem sie die Akkumulation und Aktivierung von p53 induzieren (White, 1998). In Wildtypvirus-infizierten Zellen nimmt die Menge an p53 deutlich ab und akkumuliert in Abwesenheit von E1B-55K und/oder E4orf6 (Grand *et al.*, 1994; Querido *et al.*, 1997a; Ridgway *et al.*, 1997; Steegenga *et al.*, 1998). Der Abbau von p53 ist von der Interaktion des E1B-55K-Proteins mit p53 selbst und E4orf6 abhängig (Cathomen *et al.*, 2000; Querido *et al.*, 1997a; Roth *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 2001b). Untersuchungen unter Verwendung spezifischer Proteasomeninhibitoren lassen den Schluss zu, dass die 26S-Proteasomen bei der Degradation von p53 durch den E1B-55K/E4orf6-Komplex eine Rolle spielen (Roth *et al.*, 1998; Steegenga *et al.*, 1998). Unklar ist jedoch noch, ob der Abbau von p53 an nukleären oder zytoplasmatischen Proteasomen stattfindet (Harada *et al.*, 2002). Zusätzlich zu p53 konnte Mre11, ein Bestandteil des Mre11-RAd50-NBS1 (MRN)-Komplexes, als weiteres zelluläres Substrat, identifiziert werden (Stracker *et al.*, 2002). Der MRN-Komplex ist an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, der meiotischen Rekombination und der Erhaltung der Telomere beteiligt (Zhu *et al.*, 2001). Interessanterweise führt die Aktivität des MRN-Komplexes zur Konkaterisierung doppelsträngiger viraler DNA und somit zu einer Reduktion infektiöser Nachkommenviren (Stracker *et al.*, 2002). Vor diesem Hintergrund konnte man feststellen, dass E4-deletierte Adenoviren eine starke Konkaterisierung aufweisen (Boyer *et al.*, 1999; Weiden *et al.*, 1994). E4orf3 und E4orf6 besitzen redundante Funktionen bei der Steuerung der viralen DNA-Replikation (Täuber *et al.*, 2001a; Täuber *et al.*, 2001b) und können beide die Konkaterisierung hemmen (Weiden *et al.*, 1994). Seit einiger Zeit wird vermutet, dass das E4orf3-Protein unabhängig vom E1B-55K/E4orf6-Komplex den MRN-Multi-proteinkomplex hemmt, indem es dessen subzelluläre Lokalisation ändert. Der E1B-

55K/E4orf6-Komplex dagegen veranlasst den Abbau von Mre11 über einen Ubiquitin-Proteasomen-abhängigen Weg, da auch dieser durch Proteasomeninhibitoren verhindert werden kann (Stracker *et al.*, 2002). Aktuelle Arbeiten identifizierten weiterhin DNA Ligase IV, ein wichtiges Protein der zellulären DNA-Reparatur, sowie die α 3-Untereinheit des zellulären Oberflächenrezeptorproteins Integrin als zelluläre Substrate der E1B-55K/E4orf6-E3-Ubiquitinligase (Baker *et al.*, 2007; Dallaire *et al.*, 2009).

Das Abschalten der zellulären Proteinbiosynthese in der späten Phase des adenoviralen Replikationszyklus wird zwei additiven Prozessen zugeschrieben. Zum Einen wird der Export zellulärer Transkripte blockiert, obwohl virale mRNAs weiterhin effizient aus dem Kern transportiert werden, zum Anderen wird die Initiation der Translation zellulärer mRNAs gehemmt, wobei virale Transkripte dieser Inhibition entkommen (Dobner *et al.*, 2001; Flint *et al.*, 2003). Aus den Ergebnissen zahlreicher Arbeiten konnte man schließen, dass der E1B-55K/E4orf6-Proteinkomplex für den bevorzugten nukleozytoplasmatischen Export viraler mRNA verantwortlich ist, während der Transport der zellulären Transkripte inhibiert wird (Babich *et al.*, 1983; Babiss *et al.*, 1984; Babiss *et al.*, 1985; Pilder *et al.*, 1986a; Williams *et al.*, 1986). Es wird vermutet, dass der E1B-55K/E4orf6-Komplex einen zellulären RNA-Exportfaktor bindet, proteasomal abbaut und somit zur Hemmung des zellulären mRNA Transports führt (Ornelles *et al.*, 1991). Zahlreiche aktuelle Untersuchungen beschäftigen sich mit der Identifizierung dieses Faktors. Da E1B-55K und E4orf6 ein Kernexportsignal des HIV-1 Rev-Typs (NES) besitzen, vermitteln sie vermutlich einen CRM1-abhängigen Kernexport adenoviraler mRNA (Dosch *et al.*, 2001; Krätzer *et al.*, 2000).

2.3.2 E1B-55K/E4orf3-vermittelte Funktionen

Neben der Interaktion von E1B-55K und E4orf6 an den viralen Replikationszentren infizierter Zellen, lokalisiert E1B-55K über die Interaktion mit E4orf3 zusätzlich an länglichen nukleären Strukturen, den sogenannten PODs, in denen auch das zelluläre

PML lokalisiert (Doucas *et al.*, 1996b; Leppard *et al.*, 1999; Ornelles *et al.*, 1991). Weiterhin konnten in Ad5-infizierten sowie transformierten Zellen, E1B-55K und p53 in einem zytoplasmatischen Komplex nahe des Nukleus nachgewiesen werden (Härtl *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2005; Ornelles *et al.*, 1991; Zantema *et al.*, 1985b). Es wird angenommen, dass diese Strukturen nahe des MTOC (*microtubule-organizing center*) zytoplasmatische Aggresomen darstellen. Zahlreiche Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass diese zellulären Strukturen, Orte unspezifischen Abbaus falsch gefalteter oder aggregierter Proteine sind. E1B-55K konnte in diesen Aggresomen gemeinsam mit E4orf3, Cullin-5 und Komponenten des MRN-Komplexes detektiert werden (Araujo *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005). Für Mre11 wird angenommen, dass es durch die viralen Proteine E1B-55K, E4orf3 und/oder E4orf6 aus dem Nukleus zu zellulären Aggresomen-ähnlichen Strukturen sequestriert wird, um dort proteasomal abgebaut zu werden (Liu *et al.*, 2005).

2.3.3 Funktionen von E1B-55K auf transkriptioneller und translationeller Ebene

Das E1B-55K-Protein spielt eine sehr wichtige Rolle bei der Transkription, indem es p53-aktivierte Gene inhibieren kann (Kao *et al.*, 1990b; Sarnow *et al.*, 1982a; Shen *et al.*, 2001b; Yew *et al.*, 1992a; Yew *et al.*, 1990). In der frühen Phase der Infektion kann E1B-55K mit dem Transkriptionsfaktor p53 interagieren. Dies führt zu einer E1B-55K abhängigen Arretierung transkriptionsaktivierender Eigenschaften des Tumorsuppressors (Farmer *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1998). Es wird angenommen, dass diese Hemmung der Transkription zusätzlich durch die Interaktion von E1B-55K mit einem zellulären Korepressor vermittelt wird (Martin *et al.*, 1999a). Dazu wurde beobachtet, dass Ad2 E1B-55K und Ad12 E1B-54K mit der Acetyltransferase PCAF (*p300/CBP associated factor*) wechselwirken und dadurch die physikalische Interaktion und die Acetylierung von p53 verhindern. Dies führt zu einem fast vollständigen Verlust der sequenzspezifischen DNA-Bindungsaktivität von p53 (Liu *et al.*, 2000).

Im weiteren Verlauf der Ad5-Infektion wird außerdem die Translation zellulärer

Transkripte inhibiert, während virale mRNAs effizient translatiert werden (Beltz *et al.*, 1979). Wesentlicher Bestandteil des Abschaltens der zellulären Proteinsynthese ist die Inaktivierung des Initiationsfaktors eIF4E, der für die Translation von Transkripten mit einer 5'-Cap-Struktur erforderlich ist (Huang *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1991). Der Faktor eIF4E wird durch Phosphorylierung aktiviert, bindet an das 5'-Cap von mRNAs und erleichtert so die Initiation der Translation. In der späten Phase ist die Phosphorylierung von eIF4E stark reduziert und es kann nur noch Cap-unabhängige Translation stattfinden. Virale Transkripte besitzen zwar ebenfalls ein 5'-Cap, können jedoch durch den *tripartite leader* (TPL) unabhängig von eIF4E weiter translatiert werden (Dolph *et al.*, 1990; Dolph *et al.*, 1988; Logan *et al.*, 1984). Da es mehrere Hinweise auf eine Interaktion zwischen E1B-55K und dem adenoviralen L4-100K Protein gibt, könnte E1B-55K über diese Wechselwirkung einen Einfluss auf die selektive Translation später viraler Transkripte haben (Koyuncu, 2009b). In Abwesenheit von E1B-55K konnte festgestellt werden, dass der Initiationsfaktor eIF4E phosphoryliert bleibt (Zhang *et al.*, 1994). Neueste Untersuchungen zeigen jedoch, das späte adenovirale Protein L4-100K für die Inhibition der Phosphorylierung von eIF4E verantwortlich ist (Cuesta *et al.*, 2004) und somit auch die entscheidende Rolle bei der selektiven Translation viraler Transkripte spielt (Xi *et al.*, 2004; Xi *et al.*, 2005). E1B-55K besitzt vielfältige Funktionen und ist somit essenziell für den produktiven Infektionszyklus von Ad5.

2.3.4 Funktionelle Domänen von E1B-55K

Es ist bisher bekannt, dass E1B-55K zahlreiche funktionelle Domänen aufweist und im Verlauf des produktiven Infektionszyklus posttranskriptionell modifiziert wird (Abb. 6). Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass E1B-55K ein nukleäres Exportsignal besitzt, welches an der nukleozytoplasmatischen Pendelaktivität des E1B-55K-Proteins beteiligt ist (Endter *et al.*, 2001). Die SUMO-1 Modifikation des E1B-55K-Proteins konnte ebenfalls in Zusammenhang mit dessen nukleärer Akkumulation, als auch mit der Steuerung innerhalb des Zellkerns zu spezifischen Regionen, gebracht werden (Endter *et al.*, 2001; Kindsmüller *et al.*, 2006). Weiterhin konnte in

unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die AS-Sequenz von E1B-55K, BC-Box Sequenzmotive (Blanchette *et al.*, 2008) sowie RING-Fingerdomänen (Härtl *et al.*, 2008) aufweist (Abb. 6).

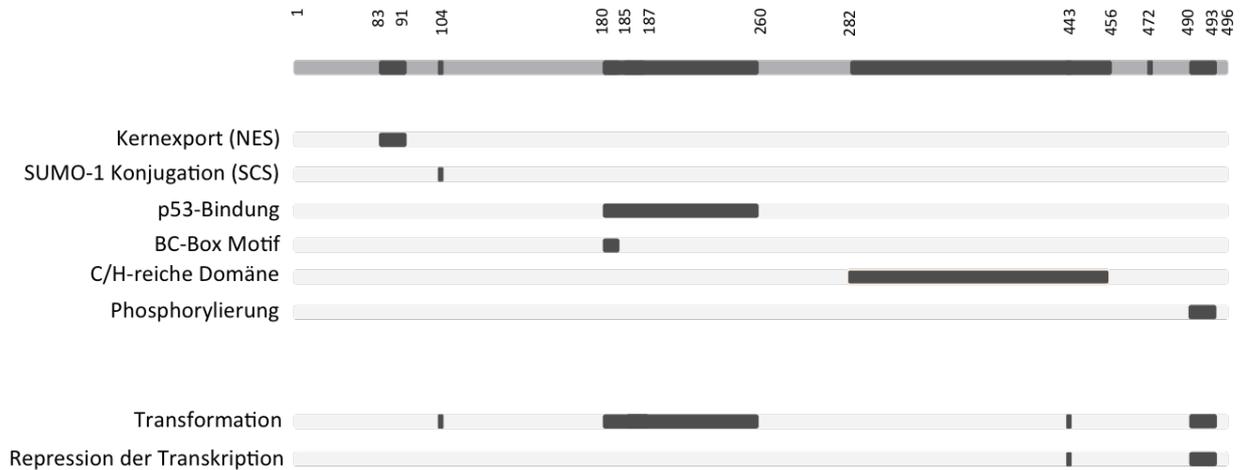


Abb. 6 Strukturelle und funktionelle Domänen von E1B-55K

Dargestellt sind die Bereiche von E1B-55K denen bestimmte Funktionen (dunkel grau hinterlegt) während des lytischen Replikationszyklus zugeordnet werden konnten. Die Zahlen markieren dabei den Anfang oder das Ende der jeweiligen Domänen. Weitere Details zu den einzelnen Bereichen sind im Text angegeben.

Ein BC-Box Motiv vermittelt die Interaktion mit Elongin B und C und ist in einer Reihe von Proteinen, einschließlich E4orf6 (Blanchette *et al.*, 2004) nachweisbar. Frühere Arbeiten ordneten das E1B-BC-Box Motiv jedoch als nicht funktionell ein (Blanchette *et al.*, 2004). RING-Finger Motive sind zinkbindende Domänen, die durch eine definierte Anordnung von Cystein- und Histidinresten gekennzeichnet sind (Matthews *et al.*, 2002). Sowohl die SCS, das NES, die BC-Box als auch die RING-Fingerdomäne im E1B-55K sind an den translationalen und transformierenden Funktionen des viralen Proteins beteiligt (Härtl *et al.*, 2008; Zeller *et al.*, 2003).

2.4 Zusammensetzung und Funktionen der subzellulären PML-NBs

PML-NBs sind nukleäre, matrixassoziierte Multiproteinkomplexe, welche je nach ihrer Zusammensetzung verschiedenste Funktionen erfüllen können (Negorev *et al.*, 2001). Diese Zellkerndomänen sind auch unter den Namen PODs, ND10 oder Kr *bodies* bekannt und konnten bisher in allen untersuchten Säugerzellen während des gesamten Zellzyklus detektiert werden (Chan *et al.*, 1997). Üblicherweise können 10–30 PML-NBs pro Zellkern mit einer Größe zwischen 0,2 und 1,0 μm in den Bereichen zwischen den Chromosomen nachgewiesen werden (Ascoli *et al.*, 1991; Dyck *et al.*, 1994b; Hodges *et al.*, 1998; Koken *et al.*, 1994; Melnick *et al.*, 1999; Plehn-Dujowich *et al.*, 2000; Weis *et al.*, 1994).

Als Hauptkomponente der PML-NBs wurde PML identifiziert, welches man mit der promyelozytischen Leukämie (APL) verbinden kann. In dieser humanen Erkrankung konnte man PML nach einer Chromosomentranslokation t (15:17) als Fusionspartner von RAR α vorfinden (de The *et al.*, 1991; Duprez *et al.*, 1992; Gillespie *et al.*, 1991; Goddard *et al.*, 1991; Kakizuka *et al.*, 1991; Pandolfi *et al.*, 1992). PML unterstützt die strukturelle Zusammensetzung der Kernstrukturen, die je nach Zelltyp, Stadium des Zellzyklus und dem Hormonstatus der Zelle sehr heterogen ist. Es wurden bereits sieben durch alternatives Spleißen entstehende Isoformen von humanem PML identifiziert. Diese lokalisieren entweder in den PML-NBs oder zu einem sehr geringen Anteil in zytoplasmatischen Komplexen sowie löslich im Zellkern (Daniel *et al.*, 1993; Dyck *et al.*, 1994a; Fagioli *et al.*, 1992; Flenghi *et al.*, 1995; Jensen *et al.*, 2001a; Terris *et al.*, 1995; Weis *et al.*, 1994). Frühere Arbeiten zeigten, dass PML als sogenanntes Gerüst für die Anlagerung weiterer PML-NB-Komponenten an die Kernstruktur verantwortlich ist. In diesem Zusammenhang konnte man beobachten, dass die rekrutierten Proteine in PML-defizienten Mausfibroblasten eine veränderte Verteilung aufweisen (Ishov *et al.*, 1999). Die Überexpression von Wildtyp-PML in diesen Zellen ermöglicht dagegen die richtige Zusammenlagerung der PML-NBs (Zhong *et al.*, 2000a). Humanes PML besitzt eine Kernimportsequenz NLS (Borden *et*

al., 1998; Saitoh *et al.*, 1997), jedoch konnte bisher keine DNA-Bindungsaktivität nachgewiesen werden (Jensen *et al.*, 2001a; Jensen *et al.*, 2001b; Zhong *et al.*, 2000a).

Bisher sind über 60 Proteine bekannt, die zusammen mit PML in den PML-NBs lokalisieren und dort meist transient vorliegen. Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass nur die zellulären Faktoren PML, Daxx, Sp100 und SUMO-1 konstitutiv in den PML-NBs vorhanden sind (Doucas *et al.*, 1996a; Ferbeyre *et al.*, 2000; LaMorte *et al.*, 1998). Eine direkte Interaktion mit PML konnte bisher nur für eine sehr geringe Zahl an Proteinen bestätigt werden, wie die Tumorsuppressoren p53 und Rb, der Transkriptionskoaktivator CBP (*CREB binding protein*), die Transkriptionsrepressoren Daxx und Sp100, das Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc9, das Ubiquitin-ähnliche Protein SUMO-1 und der Translationsinitiationsfaktor eIF4E (zur Übersicht: Cohen *et al.*, 2001; Dellaire *et al.*, 2004b; Maul *et al.*, 2000). Es ist bekannt, dass alle Komponenten der Kernstrukturen mit SUMO-1 konjugiert werden können und diese posttranslationale Modifikation für die Assemblierung der PML-NBs notwendig ist (Ishov *et al.*, 1999; Kamitani *et al.*, 1998a; Kamitani *et al.*, 1998b; Melchior, 2000a; Muller *et al.*, 1998). In Zellen, die nur PML Varianten mit verändertem SUMO-Interaktionsmotiv synthetisieren, konnte beispielsweise keine korrekte Assemblierung der PML-NBs detektiert werden (Zhong *et al.*, 2000a; Zhong *et al.*, 2000b). Aufgrund der verschiedensten Aktivitäten der PML-NB-Komponenten können den PML-NBs zahlreiche Funktionen in unterschiedlichen Bereichen wie Apoptose (Takahashi *et al.*, 2004), Differenzierung (Grobelyny *et al.*, 2000), DNA-Reparatur (Dellaire *et al.*, 2004a), posttranslationale Modifikation (D'Orazi *et al.*, 2002; Pearson *et al.*, 2000), Proteolyse (Lafarga *et al.*, 2002; Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2001), Transkriptionsregulation (Boisvert *et al.*, 2000; Borden, 2002; Zhong *et al.*, 2000c), Tumorsuppression (Salomoni *et al.*, 2002) und Zellzyklusprogression (Ruggero *et al.*, 2000) zugeschrieben werden. Weiterhin konnte eine essenzielle Rolle bei der antiviralen Zellantwort postuliert werden (Regad *et al.*, 2001a; Regad *et al.*, 2001b). Ein Hinweis auf die Beteiligung der zellulären PML-NBs an der antiviralen Zellantwort ist der Befund, dass durch IFN α (Interferon Typ I) und IFN γ (Interferon Typ II), Anzahl und Größe der PML-NBs verdoppelt und die verstärkte Expression der Interferon-abhängigen Faktoren wie Sp100, Daxx und PML

induziert werden (Grotzinger *et al.*, 1996; Lavau *et al.*, 1995).

2.4.1 Virus-induzierte Modifizierung der PML-NBs

Viele Arbeiten konnte zeigen, dass verschiedene DNA- und RNA-Viren mit den PML-NBs interagieren. Weiterhin konnten für viele Viren Genprodukte identifiziert werden, deren Angriffspunkte zelluläre PML-NB Strukturen darstellen, um den antiviralen Mechanismen der Zelle entgegenzuwirken (Everett *et al.*, 2007). Außerdem liegen die Transkriptions- und Replikationszentren vieler Viren in unmittelbarer topologischer Nähe zu den PML-NBs. Für HSV-1 (Herpes-Simplex Virus-1) konnte gezeigt werden, dass die PML-NBs für die gezielte Verteilung der viralen Replikationszentren verantwortlich sind. Auch für Ad5, SV40 (Simian-Virus Typ-40) und HCMV (Humanes Cytomegalie Virus) konnte eine enge Verknüpfung der viralen Replikationszentren mit den PML-NBs gezeigt werden (Maul *et al.*, 1996).

Adeno-, Herpes-, Hepatitis- und Papillomviren exprimieren virale Faktoren, deren Funktion die Modulierung und Auflösung der PML-NB-Strukturen ist (Bell *et al.*, 2000; Borden *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 1995b; Day *et al.*, 1998; Everett *et al.*, 1994; Everett *et al.*, 2006; Florin *et al.*, 2002; Kyratsous *et al.*, 2009; Puvion-Dutilleul *et al.*, 1995a; Tavalai *et al.*, 2008; Ullman *et al.*, 2008; Woodhall *et al.*, 2006). Auch für HIV-1 (Humanes Immundefizienzvirus Typ-1) und HTLV-1 (Humanes T-Zell-Leukämievirus Typ-1) wurden PML-NB-modulierende Proteine beschrieben (Desbois *et al.*, 1996; Doucas *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2008; Turelli *et al.*, 2001). Dabei gibt es verschiedene Mechanismen der Inaktivierung dieser Strukturen.

Das ICP0-Protein (*intracellular protein 0*) von HSV-1 reicht beispielsweise aus, um SUMO-1 modifiziertes PML, Daxx und Sp100 in den proteasomalen Abbauweg zu schleusen. Ebenso konnte man bei HCMV das IE2 Protein (*immediate early protein 2*) identifizieren, welches die Dissoziation und somit Auflösung der PML-NBs vermittelt (Chelbi-Alix *et al.*, 1999; Ishov *et al.*, 1997; Koriath *et al.*, 1996; Maul *et al.*, 1993). Zusätzlich wurde Daxx sehr früh im Infektionszyklus durch die Interaktion mit dem viralen HCMV Tegumentprotein pp71 in den proteasomalen Abbau geschleust

(Hwang *et al.*, 2007). Die lytische Replikation von EBV (Epstein Barr Virus) hingegen führt nur zu einer sequenziellen Zerstörung, wobei zunächst sehr schnell Sp100 und Daxx, später dann langsamer PML umverteilt wird (Bell *et al.*, 2000). Infektionen mit Ad5 hingegen führen nicht zur Zerstörung, sondern zu einer Umlokalisierung der PML-NBs in elongierte, fibrilläre Strukturen (*track-like structures*) wozu die Expression von E4orf3 ausreichend ist (Carvalho *et al.*, 1995a; Carvalho *et al.*, 1995b; Doucas *et al.*, 1996b; Ishov *et al.*, 1996; Puvion-Dutilleul *et al.*, 1995b). Der genaue Zusammenhang zwischen PML-NBs und dem adenoviralen Lebenszyklus ist noch unklar.

Es ist bereits bekannt, dass zahlreiche Tumorsuppressorproteine wie p53 und PML die Transkriptionsfaktoren Daxx und Sp100 sowie virale Onkoproteine wie E1A, E1B-55K und E4orf3 in den PML-NBs lokalisieren und PML-NBs bei der malignen Erkrankung APL und anderen neuronalen Tumorerkrankungen eine Rolle spielen (Regad *et al.*, 2009). Dies weist darauf hin, dass PML-NBs sowie die einzelnen zellulären Komponenten PML, Daxx und Sp100 eine zentrale Rolle bei der Adenovirus-vermittelten Transformation spielen könnten.

2.4.1.1 Daxx als zellulärer pro-apoptotischer Transkriptionsfaktor

Das humane Daxx (*death-domain-associated protein*) besteht aus 740 AS und wurde als ein multifunktionales zelluläres Protein mit einer *coiled-coil* Domäne sowie einem Serin-, Prolin-, Threonin-reichen C-Terminus identifiziert (Salomoni *et al.*, 2006). Daxx besitzt keine DNA-bindende Domäne, jedoch konnten zwei N-terminale amphipatische Helices (PAHs) mit geringer Homologie zu bereits bekannten Korepressoren wie Sin3A identifiziert werden (Hollenbach *et al.*, 1999). Tatsächlich wurde bereits gezeigt, dass Daxx einige Transkriptionsfaktoren durch Interaktion negativ beeinflusst, wie zum Beispiel Pax3 (Hollenbach *et al.*, 1999), ETS1 (Li *et al.*, 2000b), E2F1 (Michaelson *et al.*, 2003), NF- κ B (Michaelson *et al.*, 2003), p53 (Gostissa *et al.*, 2004) und p73 (Hollenbach *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003). Interessante Untersuchungen konnten diese Beobachtungen mit der Interaktion von Daxx und Chromatin-assoziierten Komponenten wie HDACs (*histone deacetylases*) und Histonen in Verbindung bringen

(Hollenbach *et al.*, 2002).

Ursprünglich wurde Daxx als Interaktionspartner des FAS-Rezeptors (CD 95/ *death receptor*) bei der FAS-abhängigen Apoptose entdeckt. Durch die Aktivierung von ASK-1 (*apoptosis-signal regulating kinase 1*) kann die FADD-unabhängige JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) -abhängige Apoptose eingeleitet werden (Yang *et al.*, 1997). Dieser Apoptoseweg scheint essenziell für den programmierten Zelltod während der Entwicklung des Nervensystems zu sein (Raoul *et al.*, 2005). Jedoch wird bis heute die genaue Rolle von Daxx am apoptotischen und nicht-apoptotischen Zelltod erst sehr wenig verstanden (Salomoni *et al.*, 2006). Da PML einerseits essenziell für die pro-apoptotischen Eigenschaften von Daxx ist und für den FAS-abhängigen Zelltod benötigt wird, nimmt man an, dass Daxx und PML in einen noch unbekanntem nukleären Apoptoseweg involviert sind (Zhong *et al.*, 2000d).

2.4.1.2 Daxx als Komponente der zellulären PML-NBs

Es konnte gezeigt werden, dass Daxx ubiquitär in allen Säugern und mit sehr hohen Proteinkonzentrationen in Thymus und Keimdrüsen exprimiert wird. Auf zellulärer Ebene wird durch das NES im C-Terminus von Daxx, nukleozytoplasmatisches Pendeln ermöglicht (Song *et al.*, 2004). Allerdings lokalisiert Daxx hauptsächlich in den nukleären PML-NBs oder komplexiert mit ATRX (*α -thalassemia/-mental retardation syndrome protein*) in Bereichen des Heterochromatins (Xue *et al.*, 2003). Eine Kollokalisierung von Daxx und ATRX konnte hauptsächlich in der S-Phase, jedoch nicht während der G₂-Phase des Zellzyklus nachgewiesen werden. Tatsächlich wurde eine Funktion dieses Komplexes bei der Umlokalisierung des Chromatins im Laufe der S-Phase festgestellt (Tang *et al.*, 2004; Xue *et al.*, 2003).

Interessante Berichte deuten darauf hin, dass bestimmte Stimuli wie zellulärer Stress durch Erhöhung der Interferonmengen oder durch Behandlung mit As₂O₃ eine verstärkte Rekrutierung von Daxx an die PML-NBs zur Folge hat. Dies lässt vermuten, dass die nukleäre Lokalisation an den PML-NBs und damit die Interaktion von Daxx

mit PML für die proapoptotischen Eigenschaften ausschlaggebend sind (Kawai *et al.*, 2003). Ein Verlust dieser Eigenschaften von Daxx konnte in PML-negativen Keratinozyten beobachtet werden (Zhong *et al.*, 2000b). Außerdem kommt es nach UV-Behandlung von primären humanen Fibroblasten vor dem Eintreten des Zelltods zu einer Umlokalisierung von Daxx an die PML-NBs (Khelifi *et al.*, 2005). Dies lässt vermuten, dass nur durch PML rekrutiertes Daxx, proapoptotische Eigenschaften hat. In Tumorzelllinien wurde dagegen festgestellt, dass die Lokalisation von Daxx sehr heterogen und nicht auf die PML-NB beschränkt ist. Dies scheint mit dem sehr seltenen Auftreten von Zelltod in Tumorzellen zu korrelieren (Michaelson *et al.*, 2003).

Interessanterweise werden auch die transkriptionsreprimierenden Eigenschaften von Daxx durch die Rekrutierung in die PML-NBs reguliert. Solange der Faktor Daxx in den PML-NBs detektiert werden kann, sind dessen reprimierende Eigenschaften inhibiert (Li *et al.*, 2000a). Es ist aber weiterhin unklar, ob zwischen den Eigenschaften von Daxx während der Apoptose und der Transkription ein Zusammenhang besteht.

2.5 Zielsetzung und Aufgabenstellung

Die Inaktivierung des zellulären Tumorsuppressorproteins p53 durch das E1B-55K-Onkoprotein spielt eine wichtige, zentrale Rolle in der Ad5-induzierten, onkogenen Transformation primärer Säugerzellen und im viralen Replikationszyklus.

Neueste Untersuchungen postulierten auch einen p53-unabhängigen Transformationsprozess, welcher durch die Modulation zellulärer Komponenten sogenannter PML-NBs vermittelt wird. An erster Stelle stehen dabei die E1B-55K-Interaktoren Mre11 (Härtl *et al.*, 2008), eine Komponente zellulärer DNA-Reparaturmechanismen und der Transkriptionsfaktor Daxx.

Auf dieser Grundlage sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Rolle von Daxx in der E1B-vermittelten Transformation primärer Säugerzellen durch genetische und biochemische Untersuchungsverfahren genauer untersucht werden. Ein weiteres Ziel war die Untersuchung der E1B/Daxx-Komplexbildung während der lytischen Replikation von Ad5.

Insgesamt sollten diese Arbeiten zu neuen grundlegenden Erkenntnissen führen, die zur Steuerung des produktiven Replikationszyklus humaner Adenoviren beitragen sowie gleichzeitig das Verständnis über molekulare Prozesse erweitern. Diese Ergebnisse könnten hinsichtlich potenzieller Zusammenhänge zwischen Virusinfektionen und menschlichen Tumorerkrankungen für verschiedene pathogene Prozesse bei Virus-Wirt-Wechselwirkungen von Bedeutung sein, Allgemeingültigkeit besitzen und als Ausgangspunkt für die Konzeption neuer antiviraler Strategien dienen.

3 Material

3.1 Zellen

3.1.1 Bakterienstämme

BEZEICHNUNG	MERKMAL
XL2-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F'proAB, lacI^qZΔM15, Tn10 (Tet^r), Amy, Cam^r]</i> (Bullock, 1987).
DH5α	<i>supE44, ΔlacU169, (φ80dlacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i> (Hanahan <i>et al.</i> , 1983).

3.1.2 Säugerzelllinien

BEZEICHNUNG	MERKMAL
Hep parental	Humane pseudo-primäre Leberzelllinie (Gripon <i>et al.</i> , 2002).
Hep shDaxx	Hep parental Zelllinie mit shRNA gegen Daxx; shRNA 5'GGA GTT GGA TCT CTC AGA A 3' (zur Verfügung gestellt von Hüseyin Sirma, HPI, Hamburg).
Hep reDaxx	Hep shDaxx Zelllinie mit rekonstituiertem Daxx; shRNA 5' GGA GTT AGA TCT GAG CGA A 3' (zur Verfügung gestellt von Roger Everett, Glasgow/UK).
Hep parental reDaxx	Hep parentale Zelllinie mit rekonstituiertem Daxx; shRNA 5' GGA GTT AGA TCT GAG CGA A 3' (zur Verfügung gestellt von Roger Everett, Glasgow/UK).
Hep shPML	Hep parental Zelllinie mit shRNA gegen sechs PML Isoformen; shRNA 5' AGA TGC AGC TGT ATC CAA G 3' (Everett <i>et al.</i> , 2006).
pBRK	Primäre Nierenzellen aus 3-5 Tage alten CD-Ratten (Charles River).
BRK1	Spontan immortalisierte BRK-Zellen (Endter <i>et al.</i> , 2005).
AB120	Etablierte Rattenzelllinie, stabil transformiert mit Ad5 E1A sowie Ad5 E1B-55K (Nevels, 1999).

MATERIAL

ABS1	Etablierte Rattenzelllinie, stabil transformiert mit Ad5 E1A (Ad5 E1A-12S und Ad5 E1A-13S), sowie Ad5 E1B-55K und Ad5 E4orf6 (Nevels, 1999).
911	Ad5-transformierte, humane, embryonale Retinoblastom Zelllinie. Die Ad5 E1-Region ist stabil im Genom integriert und exprimiert die adenoviralen E1A- und E1B-Genprodukte (Fallaux et al., 1996).
A549	Humane Lungenkarzinom Zelllinie, Wildtyp p53 (Giard <i>et al.</i> , 1973).
AsiDaxx	A549 Zelllinie mit shRNA gegen Daxx; shRNA 5' GGA GTT GGA TCT CTC AGA A 3' (diese Arbeit).
AsiGFP	A549 Zelllinie mit shRNA gegen GFP (diese Arbeit).
H1299	Humane, p53-negative Lungenkarzinom Zelllinie (Mitsudomi <i>et al.</i> , 1992).
HsiDaxx	H1299 Zelllinie mit shRNA gegen Daxx; shRNA 5' GGA GTT GGA TCT CTC AGA A 3' (diese Arbeit).
HsiGFP	H1299 Zelllinie mit shRNA gegen GFP (diese Arbeit).
H1299 Cullin-5 negativ	H1299 Zelllinie mit shRNA gegen Cullin-5 (Dallaire et al., 2009).
H1299 Ubi	H1299 Zelllinie mit Überexpression von Ubiquitin (wt) mit GFP- und Histidin Epitop Fusion (zur Verfügung gestellt von Paola Blanchette, Montreal/Kanada).
H1299 Ubi K48R	H1299 Zelllinie mit Überexpression von Ubiquitin (K48R) mit GFP- und Histidin Epitop Fusion (zur Verfügung gestellt von Paola Blanchette, Montreal/Kanada).
HEK 293	Humane, embryonale Nierenzellen, die die Ad5 E1-Region stabil exprimieren (human embryonic kidney cells; Graham <i>et al.</i> , 1977).
HEK 293T	HEK 293 Zellen, die das Large T Antigen des SV40 (Simian Virus 40) exprimieren.
2E2	293 EBNA Tet Zelllinie, generiert aus HEK 293. Ad5 E2A und E4orf6 sind tetrazyklinabhängig induzierbar (Catalucci <i>et al.</i> , 2005).
U2OS	Humane, epitheliale Osteosarkomzelllinie, Wildtyp p53 and Rb, p16-negativ (Ponten <i>et al.</i> , 1967).
SAOS-2	Humane Osteosarkomzelllinie (Fogh <i>et al.</i> , 1977).

3.2 Adenoviren

Die in dieser Arbeit verwendeten und generierten Adenoviren wurden im H5pg4100-Rückgrat hergestellt.

BEZEICHNUNG	MERKMAL
H5pg4100	Wildtyp Ad5 mit einer 1863 Bp langen Deletion (nt 28602 bis nt 30465) des Ad5 E3-Leserahmens (Kinds Müller <i>et al.</i> , 2006).
H5pm4101	Ad5 E1B-55K-Mutante (L83A, L87A und L91A) mit 3 AS-Austauschen im NES an den Positionen 83, 87 und 91 (Kinds Müller <i>et al.</i> , 2006).
H5pm4102	Ad5 E1B-55K-Mutante (K104R) mit einem AS-Austausch im SKM an Position 104 (Kinds Müller <i>et al.</i> , 2006).
H5pm4103	Ad5 E1B-55K-Mutante (L83AL87AL91A/K104R) mit AS-Austauschen im NES und im SKM (Kinds Müller <i>et al.</i> , 2006).
H5pm4127	Ad5 E1B-55K-Mutante (C454S und C456S) mit AS-Austauschen an den Positionen 454 und 456 (Stammsammlung der Arbeitsgruppe).
H5pm4149	Ad5 E1B-55K-Mutante mit vier Stoppkodons an den AS-Positionen 3, 8, 86 und 88 (Kinds Müller <i>et al.</i> , 2009).
H5pm4150	Ad5 E4orf3-Mutante mit einer <i>frame shift</i> Mutation nach Kodon 36 durch ein eingeführtes Thymidin an Position nt 34592 (erster Stopp bei Kodon 38; Stammsammlung der Arbeitsgruppe).
H5pm4154	Ad5 E4orf6-Mutante mit einem AS Austausch zum Stopp-Kodon an der Position 66 (Blanchette <i>et al.</i> , 2004).
H5pm4155	Ad5 E4orf3-E4orf6-Doppelmutante. Kombination aus H5pm4150 und H5pm4154 (Stammsammlung der Arbeitsgruppe).
H5pm4174	Ad5 E1B-55K-Mutante (S490/491AT495A) mit AS Austausch an der Position 490, 491 und 495 (Stammsammlung der Arbeitsgruppe).
H5pm4197	Ad5 E1B-55K-Mutante (E472A) mit AS Austausch an der Position 472 (diese Arbeit).
H5pm4198	Ad5 E1B-55K-Mutante (KK185/187AA) mit AS Austausch an den Positionen 185 und 187 (diese Arbeit).

3.3 Nukleinsäuren

3.3.1 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden als Startermoleküle für Sequenzreaktionen, PCR-Amplifikationen und die Einführung von Mutationen durch PCR verwendet. Sie wurden von der Firma Metabion bezogen. In der ersten Spalte ist die Nummer des Oligonukleotids in der *Filemaker Pro*-Datenbank der Arbeitsgruppe angegeben. Oligonukleotide, deren Nummern mit einem M versehen sind, wurden von der Firma Alpha DNA bestellt und von der Arbeitsgruppe Phil Branton (McGill University, Montreal/Kanada) zur Verfügung gestellt.

#	BEZEICHNUNG	SEQUENZ	VERWENDUNG
64	E1B bp2043 fw	CGC GGG ATC CAT GGA GCG AAG AAA CCC ATC TGA GC	virale DNA- Replikation
110	E1B 361-389 rev	CGG TGT CTG GTC ATT AAG CTA AAA	virale DNA- Replikation
635	pcDNA3 fw	ATG TCG TAA CAA CTC CGC	Sequenzierung
780	Seq E1-Box fw 1251bp	GTC CTG TGT CTG AAC CTG AGC	Sequenzierung
781	Seq E1-Box fw 1582bp	GAT TGC GTG TGT GGT TAA CGC	Sequenzierung
782	Seq E1-Box fw 2454bp	CAA GGA TAA TTG CGC TAA TGA GC	Sequenzierung
783	Seq E1B-Box rev 3373bp	CCA CAC TCG CAG GGT CTG C	Sequenzierung
1318	E1Bseq 978-999	GGC CTC CGA CTG TGG TTG CTT C	Sequenzierung
1371	18s rRNA fw	CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA	RT-PCR
1372	18s rRNA rev	GCT GGA ATT ACC GCG GCT	RT-PCR
1441	Hexon qPCR fw	CGC TGG ACA TGA CTT TTG AG	RT-PCR
1442	Hexon qPCR rev	GAA CGG TGT GCG CAG GTA	RT-PCR
1569	E1B qPCR fw	GAG GGT AAC TCC AGG GTG CG	RT-PCR
1570	E1B qPCR rev	TTT CAC TAG CAT GAA GCA ACC ACA	RT-PCR
1571	DBP qPCR fw	GAA ATT ACG GTG ATG AAC CCG	RT-PCR
1572	DBP qPCR rev	CAG CCT CCA TGC CCT TCT CC	RT-PCR
1643	E1B R443A fw	GG AAG GTG CTG GCG TAC GAT GAG ACC C	Mutagenese
1644	E1B R443A rev	G GGT CTC ATC CGC CCT CAG CAC CTT CC	Mutagenese
1645	E1B R443ins fw	GG AAG GTG CTG AGG CTG GGA TTC CAG TAC GAT GAG ACC C	Mutagenese

MATERIAL

1646	E1B R443ins rev	G GGT CTC ATC GTA CTG GAA TCC CAG CCT CAG CAC CTT CC	Mutagenese
1841	Daxx seq1 fw	CCT CAA GAC GTT GTA GGA GAG ATC CC	Sequenzierung
1842	Daxx seq2 rev	A AGT TCA GCT TCT TTT TGG CTG AGT GGG	Sequenzierung
1843	Daxx seq3 fw	TCT CCA ATT GTC CGC GTA ACT CGC C	Sequenzierung
1844	Daxx seq4 fw	TGC TTC TGC TAC TCC TCT CAC TAC TCC	Sequenzierung
1845	Daxx seq5 fw	AAG TGG TGA CAG AAT CTC TTA CC	Sequenzierung
M142	E1B SK189/190RR fw	GCA AGT ACA AGA TCG CCG CAC TTG TAA ATA TCA GG	Mutagenese
M143	E1B SK189/190RR rev	CCT GAT ATT TAC AAG TGC GGC GAT CTT GTA CTT TGC	Mutagenese
M144	E1B P182A fw	GGC ACT TAG GGC AGA TTG CAA GTA AC	Mutagenese
M145	E1B P182A rev	GTA CTT GCA ATC TGC CCT AAG TGC C	Mutagenese
M146	E1B KK185/187AA fw	GCC AGA TTG CGC CGT ACG CGA TCA GCA AAC TTG	Mutagenese
M147	E1B KK185/187AA rev	CAA GTT TGC TGA TCG CGT ACG CGC AAT CTG GC	Mutagenese
M148	E1B RTR 448/449/459AAA fw	CGA TGA GAC CGC CGC CGC GTG CAG ACC CTG C	Mutagenese
M149	E1B RTR 448/449/459AAA rev	GCA GGG TCT GCA CGC GGC GGC GGT CTC ATC G	Mutagenese
M150	E1B E446A fw	GCT GAG GTA CGA TGC GAC CCG CAC CAG G	Mutagenese
M151	E1B E446A rev	CCT GGT GCG GGT CGC ATC GTA CCT CAG C	Mutagenese
M152	E1B E472A fw	GCT GGA TGT GAC CGC GGA GCT GAG GCC CG	Mutagenese
M153	E1B E472A rev	CGG GCC TCA GCT CCG CGG TCA CAT CCA GC	Mutagenese

3.3.2 Expressionsvektoren

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

#	BEZEICHNUNG	VERWENDUNG	REFERENZ
77	pGL2-basic	<i>Firefly</i> -Luziferase-Assay	Promega
136	pcDNA3	Expressionsvektor für Säugerzellen, CMV-Promotor	Invitrogen

MATERIAL

129	pG4	Expressionsvektor für Gal4-Fusionen	(Sadowski <i>et al.</i> , 1989)
181	pRL-TK	<i>Renilla</i> -Luziferaseassay	Promega
222	LEGO-iV2	Lentiviraler Expressionsvektor	(Weber <i>et al.</i> , 2008)
223	LEGO-iCer2	Lentiviraler Expressionsvektor	(Weber <i>et al.</i> , 2008)

3.3.3 Rekombinante Plasmide

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

#	BEZEICHNUNG	VEKTOR	FREMDGEN-EXPRESSION	REFERENZ
2	pC53SN3	pCMV/neo	humanes p53 cDNA	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
79	pGL-2 promotor	pGL-2 basic	Luziferase-gekoppelter Promotor mit GAL-Bindestelle	Promega
375	pGalTK-LUC	pG4	Luziferaseassay; Expressionsvektor für Gal4-Fusionen	(Sadowski <i>et al.</i> , 1989)
401	pGL E1B-LUC	pGL-2 basic	Luziferaseassay; Luziferase-gekoppelter E1B-Promotor	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
499	pRE-LUC	unbekannt	Luziferaseassay; CMV-Promotor, fünf p53-Bindungsstellen	N. Horikoshi
668	pcDNA-E4orf3	pcDNA3	Ad5 E4orf3	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
715	pcDNA3-E4orf6flu	pcDNA3	Ad5 E4orf6	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1154	Ad5pTG-S2 (Noah)	pTG	Ad5 Genom	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1235	E1-Box pPG-S3	pPG-S3	Ad5 E1-Region	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1282	pcDNA3-E1B C454SC456S	pcDNA3	Ad5 E1B-55K	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1319	pcDNA-E1B-55K	pcDNA3	Ad5 E1B-55K	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1607	pcDNA3-Flu hDaxx	pcDNA3	humanes Daxx	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1983	LEGO-iCer2_E1B-55K	LEGO-iCer2	Ad5 E1B-55K	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1997	LEGO-iV2-E1A	LEGO-iV2	Ad5 E1A	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1968	pCMV-VSV-G	pCMV	Hüllprotein G (VSV-G) des vesikulären	(Beyer <i>et al.</i> , 2002)

MATERIAL

1969	pRSV-Rev	pRSV	Stomatitis-Virus HIV-1 <i>Rev</i>	(Dull <i>et al.</i> , 1998)
1970	pMDLg/pRRE	pMDL	HIV-1 <i>Gag</i> , HIV-1 <i>Pol</i>	(Dull <i>et al.</i> , 1998)
2140	E1B-55K R443 insertion	pcDNA3	Ad5 E1B-55K	diese Arbeit
2141	E1B-55K R443A	pcDNA3	Ad5 E1B-55K	diese Arbeit
2142	E1B-55K-GAL- RTR448/449/450AAA	pG4	Ad5 E1B-55K	diese Arbeit
2143	E1B-55K-GAL-KK185/187AA	pG4	Ad5 E1B-55K	diese Arbeit
2154	E1B-55K-GAL-E472A	pG4	Ad5 E1B-55K	diese Arbeit
2155	E1B-55K P182A	pcDNA3	Ad5 E1B-55K	diese Arbeit
2047	Ad5pPG-S2 E1B E472A	pPG-S2	Ad5	diese Arbeit
2048	Ad5pPG-S2 E1B K185,187A	pPG-S2	Ad5	diese Arbeit
2157	E1B-55K KK185/187AA	pcDNA3	Ad5 E1B-55K	diese Arbeit
2191	E1B-55K SK189/190RR	pcDNA3	Ad5 E1B-55K	diese Arbeit
2192	E1B-55K E446A	pcDNA3	Ad5 E1B-55K	diese Arbeit
2193	E1B-55K- RTR448/449/450AAA	pcDNA3	Ad5 E1B-55K	diese Arbeit
2194	E1B-55K-E472A	pcDNA3	Ad5 E1B-55K	diese Arbeit
2196	E1B-55K KK185/187AA	pPG-S2	Ad5 E1-Region	diese Arbeit
2198	E1B-55K E472A	pPG-S2	Ad5 E1-Region	diese Arbeit
2207	Lego-iCer2-E1B-55K- KK185/187AA	LEGO-iCer2	Ad5 E1B-55K	diese Arbeit
2208	Lego-iCer2-E1B-55K-E472A	LEGO-iCer2	Ad5 E1B-55K	diese Arbeit
2209	Lego-iCer2-E1B-55K- RTR448/449/450AAA	LEGO-iCer2	Ad5 E1B-55K	diese Arbeit
2261	pcDNA3-pVII	pcDNA3	Ad5 pVII	Harald Wodrich
2262	pcDNA3-ppVII	pcDNA3	Ad5 ppVII	Harald Wodrich

3.4 Antikörper

3.4.1 Primärantikörper

BEZEICHNUNG	EIGENSCHAFTEN
M73	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen E1A-Proteine (E1A-12S und E1A-13S) von Ad5 (Harlow <i>et al.</i> , 1985).
2A6	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das E1B-55K-Protein von Ad5 (Sarnow <i>et al.</i> , 1982c).
4E8	Monoklonaler Ratten-Antikörper gegen das E1B-55K-Protein von Ad5 (Kindsmuller <i>et al.</i> , 2009).

MATERIAL

B6-8	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das E2A-Protein von Ad5 (Reich <i>et al.</i> , 1983).
6A11	Monoklonaler Ratten-Antikörper gegen das E4orf3-Protein von Ad5 (Nevels <i>et al.</i> , 1999).
1807	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das E4orf6-Protein von Ad5 (Boivin <i>et al.</i> , 1999).
RSA3	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen den Aminoterminus des E4orf6- und E4orf6/7-Proteins von Ad5 (Marton <i>et al.</i> , 1990).
6B10	Monoklonaler Ratten-Antikörper gegen das L4-100K-Protein von Ad5 (Stammsammlung der Arbeitsgruppe).
α-late	Polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen späte Strukturproteine von Ad5 (Stammsammlung der Arbeitsgruppe).
α-pVII	Monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das Genom-assoziierte Protein pVII von Ad5 (nicht veröffentlicht; zur Verfügung gestellt von Harald Wodrich/Bordeaux, Frankreich).
β-Aktin (AC-15)	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen β -Aktin (Sigma, Katalog-Nummer: A5441).
α-GFP	Monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Volllänge GFP (<i>green fluorescent protein</i> ; Santa Cruz Biotechnology, Katalog-Nummer: sc8334).
α-RGS-Histidin	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das RGS-Histidin Epitop Qiagen, Katalog-Nummer: 34610).
α-HA	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das HA-Epitop (Covance, Katalog-Nummer: PRB-101P).
α-HA-3F10	Monoklonaler Ratten-Antikörper gegen das HA-Epitop (Roche, Katalog Nummer: 2013819).
α-Daxx	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das humane, sowie Ratten Daxx-Protein (Upstate/Millipore, Katalog-Nummer: 0747).
α-Mre11	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das humane Mre11-Protein (Novus Biologicals, Inc, Katalog-Nummer: pNB 100-142).
α-PML	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen humanes PML (Santa Cruz Biotechnology, Katalog-Nummer: sc5621).
α-p53 (Fl393)	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen humanes p53 (Santa Cruz Biotechnology, Katalog-Nummer: sc6243).
α-p53 (DO-1)	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen ein aminoterminales Epitop von p53 des Menschen (Santa Cruz Biotechnology, Katalog-Nummer: sc126; (Vojtesek <i>et al.</i> , 1992).

3.4.2 Sekundärantikörper

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

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

Folgende Sekundärantikörper wurden für Immunfluoreszenzanalysen verwendet:

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

3.5 Kommerzielle Systeme

Folgende kommerzielle Systeme wurden verwendet:

BEZEICHNUNG	HERSTELLER
Dual-Luciferase Assay System	Promega
Plasmid Purification Mini, Midi und Maxi Kit	Qiagen
Protein Assay	BioRad
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
RNeasy Mini Kit	Qiagen
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce

3.6 Enzyme, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Falls im Text nicht anders aufgeführt, wurden alle Chemikalien von den Firmen AppliChem, Biomol, Hartenstein, Invitrogen, New England Biolabs, Merck, Roche, und Sigma bezogen. Zellkulturmaterial von den Firmen PAA und Pan, sonstiges Plastikmaterial von den Firmen Biorad, Biozym, Brand, Eppendorf GmbH, Sarstedt, Whatman und VWR bezogen.

3.7 Größen- und Molekulargewichtstandards

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Molekülen in Agarosegelen wurde die *1 kb* und *100 kb DNA ladder* (Gibco BRL) verwendet. Für die Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen bei der SDS-Gelelektrophorese wurde der *Page Ruler Protein Ladder* (Fermentas) verwendet.

3.8 Versuchstiere

Klassische Transformationsversuche (4.2.6) wurden in pBRK-Zellen durchgeführt. Die Nieren wurden aus 3-5 Tage alten CD-Ratten (Charles River, Kißlegg) entnommen.

3.9 Software und Datenbanken

Texte und Tabellen dieser Arbeit wurden mit dem Mac OS X 10.5.8 Betriebssystem erstellt. Zeichnungen, Diagramme und Abbildungen wurden mit den Programmen Adobe Photoshop CS4 (*Adobe*) und Adobe Illustrator CS4 (*Adobe*) angefertigt. Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm *BioEdit* 4.8.5 sowie der *CLC Workbench* und der *Vector NTI* Software erzeugt (Hall, 1999). Zur densitometrischen Auswertung der Bandenintensität von DNA in Agarosegelen wurde die Software *Gene tools* des G-Box-Systems (Syngene) verwendet. Zur Archivierung der verwendeten Antikörper sowie der generierten Adenovirusmutanten, Plasmide, Oligonukleotide und Vektoren wurde die Software *File Maker Pro 8.0* verwendet. Für die Literatursuche wurde die MEDLINE-Datenbank (National Library of Medicine) unter der Adresse <http://www.ncbi.nlm.gov/PubMed/> benutzt. Die Literaturangaben in dieser Arbeit wurden mit *EndNote X2* eingefügt und bearbeitet.

4 Methoden

4.1 Bakterien

4.1.1 Kulturbedingungen und Lagerung

Für die Anzucht von *E. coli* in Flüssigkultur wurde steriles LB-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und in Gegenwart entsprechender Antibiotika über Nacht bei 37 °C und 150 - 220 UpM in einem Inkubationsschüttler (New Brunswick) inkubiert. *E. coli*-Kulturen, die ein für Ad5 E1B-55K kodierendes Plasmid enthielten, wurden bei 30 °C und 150 - 220 Upm inkubiert, um eine Insertion des Transposons *tn10* in den offenen Leserahmen des E1B-Gens zu unterdrücken. Für die Anzucht von *E. coli* auf LB-Platten wurden aus einer Flüssig- oder Glycerinkultur Bakterien entnommen und auf einer Agarplatte mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen ausgestrichen. Aus Übernachtinkubationen konnten dann Einzelkolonien isoliert werden. Die so erhaltenen Plattenkulturen sind mit Parafilm (*Pechiney Plastic Packaging*) verschlossen mehrere Wochen bei 4 °C haltbar. Zur Lagerung der generierten transgenen Bakterien wurden Glycerinkulturen hergestellt. Dazu wurden die Bakterien einer Einzelkolonie in Flüssigkultur genommen und kurz vor Erreichen der stationären Phase abzentrifugiert (4000 UpM, 5 min; Kühlzentrifuge 5417 R, Eppendorf GmbH). Das Sediment wurde in 0,5 ml LB-Medium resuspendiert und in *CryoTubes*TM (Sarstedt) mit 0,5 ml sterilem Glycerin vermischt. Diese Dauerkulturen sind nahezu unbegrenzt bei -80 °C haltbar.

LB-Medium		Trypton	10 g/l
		Hefeextrakt	5 g/l
		NaCl	5 g/l
		• autoklavieren	
Antibiotika- Stammlösungen		Ampicillin (500 x)	50 mg/ml in H ₂ O _{bid}
		• sterilfiltrieren	
		• bei -20 °C lagern	

4.1.2 Transformation von *E. coli*

4.1.2.1 Elektroporationsmethode

Die Herstellung elektrokompenter *E. coli* erfolgte nach Sharma und Schimke (Sharma *et al.*, 1996). 1L YENB-Medium wurde mit 10 ml einer frischen Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5–0,9 bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden 5 min auf Eis gekühlt und anschließend 10 min bei 6000 UpM und 4 °C abzentrifugiert (Avanti J-E Centrifuge, Beckman Coulter). Das Bakteriensediment wurde daraufhin zweimal mit 100 ml eiskaltem H₂O_{bid} und einmal mit 20 ml 10%igem Glycerin gewaschen. Es wurde dann in einem Endvolumen von 3 ml 10%igem Glycerin aufgenommen, in Aliquots von je 50 µl aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Die elektrokompenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl der Bakteriensuspension mit 1–10 µg Plasmid-DNA vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (BioRad) mit einem Elektrodenabstand von 1 mm überführt. Die Elektroporation erfolgte in einem *Gene Pulser* (BioRad) nach den Anweisungen des Herstellers bei einer Spannung von 1,25 kV, einer Kapazität von 25 µF sowie einem Parallelwiderstand von 200 Ω. Dabei wurde eine Zeitkonstante von ca. 5 ms erreicht. Nach dem Puls wurden die Bakterien sofort mit 1 ml LB-Medium ohne Zusatz von Antibiotika aus den Küvetten gespült, in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt) überführt und 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden sie abzentrifugiert (4000 UpM, 10 min; Kühlzentrifuge 5417 R, Eppendorf GmbH) in ca. 50 µl Überstand resuspendiert und auf LB-Nährböden mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 30 °C bzw. 37 °C bebrütet.

YENB	Bacto Yeast Extract Bacto Nutrient Broth • autoklavieren	7,5 g/l 8 g/l
-------------	--	------------------

4.1.2.2 Chemische Transformation von *E. coli*

Zur Transformation wurden chemisch-kompetente DH5- α oder superkompetente XL2-Blue (Stratagene) *E. coli* Stämme zunächst auf Eis aufgetaut und ein Aliquot von 50–100 μ l in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße transferiert, mit 2 μ l β -Mercaptoethanol (1,22 M), sowie 1–10 μ g Plasmid-DNA vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 s wurden die Bakterien 2 min auf Eis abgekühlt und danach mit 500 μ l auf 37 °C vorgewärmten NZCYM- oder SOC-Medium versetzt. Die Bakterien wurden dann 1 h bei 37 °C und 220 UpM im Inkubationsschüttler (New Brunswick) regeneriert, kurz abzentrifugiert (4000 UpM, 3 min; Kühlzentrifuge 5417 R, Eppendorf GmbH) und in 50 μ l LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika resuspendiert. Anschließend wurde der Ansatz auf LB-Agarplatten mit geeigneten Antibiotika ausplattiert.

SOC-Medium	Trypton	20 g/l	
	Hefeextrakt	5 g/l	
	NaCl	10 mM	
	KCl	2,5 mM	
	MgCl ₂	10 mM	
	MgSO ₄	10 mM	
	Glukose	20 mM	
	• autoklavieren		
	NZCYM	NZ Amin	10 g/l
		NaCl	0,5 g/l
Hefeextrakt		0,2 g/l	
MgSO ₄ x 6 H ₂ O		0,2 g/l	
Casaminosäuren		1 g/l	
• pH 7,5 einstellen mit NaOH			
• autoklavieren			

4.2 Säugerzellen

4.2.1 Kultivierung und Lagerung von etablierten Säugerzellen

In dieser Arbeit wurden adhärente Zellen verwendet, welche als Einschichtkulturen in Petrischalen (Sarstedt/Falcon) kultiviert wurden. Als Nährmedium diente *Dulbecco's Modified Eagles Medium* mit 0,11 g/l Natriumpyruvat (DMEM; Gibco BRL; Dulbecco *et al.*, 1959). Das Medium wurde mit 5% oder 10% fötalem Kälberserum (FKS; PAN)

METHODEN

angereichert und mit 1% einer Penicillin/Streptomycin-Lösung (1000 U/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin in 0,9% NaCl; PAA) versetzt. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Leberzellen (Hep parental, Hep shDaxx und Hep shPML) wurden dem Nährmedium noch 5 µg/ml Bovines Insulin (Sigma), sowie 0,5 µM Hydrocortison zugesetzt (Gripon *et al.*, 2002). Die Zellen wurden bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator (Heraeus) mit 5%iger CO₂-Atmosphäre inkubiert und regelmäßig mit frischem Medium versorgt. Alle 3–5 Tage wurden die Zellen abhängig von der Zelldichte im Verhältnis 1:5 bis 1:20 subkultiviert. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, die adhärennten Zellen wurden mit sterilem PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (PAA) von den Zellkulturgefäßen abgelöst. Nach Kompetition der Proteaseaktivität des Trypsins durch Zugabe von 1 Vol. mit FKS angereichertem Medium wurden die abgelösten Zellen in einem 15 ml oder 50 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) abzentrifugiert (2000 UpM, 3 min; Multifuge 3S-R, Thermo). Der Überstand wurde anschließend abgesaugt und das Zellpellet in DMEM resuspendiert. Danach wurden die Zellen in einem geeigneten Verhältnis auf neue Kulturgefäße verteilt, die bereits vorgewärmtes Medium mit 5% oder 10% FKS, Antibiotika sowie den entsprechenden Zusätzen enthielten. Zellen, die zur Transfektion oder Infektion weiter verwendet werden sollten, wurden vor der Verteilung auf entsprechende Kulturgefäße gezählt. Dazu wurde das abzentrifugierte Zellpellet je nach Zelldichte in DMEM resuspendiert. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau vermischt. In eine Zellzählkammer (Neubauer) wurde ein Tropfen dieser Flüssigkeit überführt. Die genau Zellzahl wurde durch Auszählen von 16 Kleinquadraten des kammereigenen Rasters im Lichtmikroskop (Leica DM IL) und anschließender Berechnung mit der Formel: Zellzahl/ml = gezählte Zellen x 2 (Verdünnungsfaktor) x 10⁴ ermittelt.

PBS (pH 7,3)	NaCl		140 mM
	KCl		3 mM
	Na ₂ HPO ₄		4 mM
	KH ₂ PO ₄	in H ₂ O	1,5 mM
	⇒ autoklavieren		
Trypanblau Lösung	Trypanblau		0,15%
	NaCl	in H ₂ O	0,85%

4.2.2 Gewinnung und Kultivierung primärer Rattennierenzellen

Zur Gewinnung primärer Rattennierenzellen wurden die Nieren von 3-5 Tage alten CD-Ratten unter semisterilen Bedingungen entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in einem 50 ml Reaktionsgefäß mit sterilem PBS bei RT aufbewahrt. Die Nieren wurden dann unter sterilen Bedingungen mit Pinzette und Skalpell in einer Petrischale mit sterilem PBS mechanisch zerkleinert und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Je 20 Nieren wurden in 20 ml sterilem PBS mit 1 mg/ml Kollagenase/Dispase (Roche) bei 37 °C für 3-4 h unter mehrmaligem Schütteln im Brutschrank inkubiert. Nach Zentrifugation (2000 UpM, 4 °C, 10 min; Multifuge 3S-R, Thermo) wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet zweimal mit je 20 ml sterilem PBS gewaschen und in angereichertem DMEM-Medium resuspendiert und kultiviert. Schließlich wurden pro 100 mm-Zellkulturschale die Zellen von je vier Nieren in vorgewärmtem Medium mit 10% FKS ausgesät und im CO₂-Brutschrank (Heraeus) in 5%iger CO₂-Atmosphäre bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt und die Zellen wie unter 4.2.1 beschrieben, weiterkultiviert.

4.2.3 Lagerung von Säugerzellen

Für die dauerhafte Lagerung von Säugerzellen wurden subkonfluente Zellen nach vorheriger Ablösung durch Trypsin/EDTA (4.2.1) zentrifugiert (2000 UpM, 3 min; Multifuge 3S-R, Thermo) und das Zellsediment in 1 ml FKS (PAN) mit 10% DMSO (Sigma) aufgenommen und in *CryoTubes*TM (Sarstedt) überführt. Die Kühlung der Zellen erfolgte mit Hilfe des Cryo-Einfriergeräts „*Mr. Frosty*“ (Zefa Laborservice) nach Angaben des Herstellers. Zur Rekultivierung wurden die tiefgefrorenen Zellen bei 37 °C rasch aufgetaut und die Zellsuspension in einer geeigneten Kulturplatte mit vorgewärmtem Medium bei 37 °C inkubiert. Um vorhandenes DMSO zu entfernen, wurde nach Absetzen der Zellen auf dem Petrischalenboden nach 4-5 h, das vorhandene Medium ersetzt und die Zellen weiterkultiviert.

4.2.4 Transfektion/Transduktion von Säugerzellen

4.2.4.1 Polyethylenimin (PEI-) Methode

Polyethylenimin (PEI, 25 kDa, Polysciences) ist ein polykationisches Polymer, welches negativ geladen DNA aus dem Medium in die Säugerzelle transportieren kann. Die elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem kationischen PEI und der anionischen DNA führt zur Bildung eines Komplexes mit positiv geladener Oberfläche. Dieser kann an die negativ geladene Zelloberfläche binden, sowie durch Endozytose ins Zellinnere gelangen. Manche der aufgenommenen Vesikel lösen sich bereits im Zytoplasma auf, der Rest gelangt in den Zellkern, wo DNA freigesetzt, transkribiert und translatiert werden kann. Adhärente Zellen wurden in Kulturschalen mit sechs Vertiefungen (*6-well* Schale; Sarstedt) oder Zellkulturpetrischalen mit einem Durchmesser von 100 mm ausgesät, in Vollmedium (DMEM, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin) kultiviert und 24 h später transfiziert. Zur Transfektion wurde ein DNA-PEI Gemisch (1:10) hergestellt und in 0,5 ml DMEM ohne Zusätze resuspendiert. Nach 20 min Inkubation bei RT und mehrmaligem Vortexen wurde das Transfektionsgemisch zu den Zellen gegeben, deren Nährmedium kurz zuvor auf DMEM mit 5% FKS ohne Antibiotika umgestellt wurde. 6-8 h nach der Transfektion (h p.t.) wurde das Medium durch Vollmedium Vollmedium (DMEM, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin) ersetzt. Die transfizierten Zellen konnten 24 bis 72 h p.t. geerntet werden. PEI wurde zuvor in H₂O_{bid.} gelöst. Bei einer Endkonzentration von 1 mg/ml wurde durch Zugabe von 0,1 N HCl ein neutraler pH-Wert von 7,2 eingestellt. Die Lösung wurde sterilfiltriert (Porengröße 0,45 µm) und bei -80°C bis zu 6 Monaten aufbewahrt.

4.2.4.2 Liposomen-Methode

Um sehr große DNA-Mengen in eukaryotische Zellen zu transfizieren wurde das Lipofectamin-Transfektionssystem von Invitrogen benutzt (*LipofectamineTM2000 reagent*). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Anlagerung von positiv geladenen kationischen Lipiden zu Liposomen oder kleinen Vesikeln, welche die negativ geladene DNA umschließen. Diese Lipid-DNA-Komplexe fusionieren an-

schließlich mit der Zellmembran und ermöglichen somit den Transport der DNA in die Zellen. 24 h vor der Transfektion wurden adhärente Zellen in einer 6-well Schale oder Zellkulturpetrischalen ausgesät und mit Vollmedium (DMEM, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin) kultiviert. Die Zellen waren am nächsten Tag zu 60 – 80% konfluent und wurden nach Angaben des Herstellers transfiziert. Nach 24–72 h p.t. wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen (4.6.1) und für SDS-PAGE (4.6.3) verwendet.

4.2.4.3 Lentivirus-basierte Methode

Virale Vektoren können verwendet werden um genetische Informationen in eukaryotische Zellen einzubringen. Lentivirale Vektoren haben gegenüber anderen viralen Vektoren den Vorteil, dass sie in der Lage sind, ruhende oder nur langsam teilende Zellen zu infizieren und ihr genetisches Material in das Genom der Zielzelle zu integrieren. Dies führt zu einer stabilen Expression des Zielgens in den infizierten Zellen und deren Tochterzelle.

4.2.4.3.1 Herstellung rekombinanter Lentiviruspartikel

Bei den in dieser Arbeit verwendeten lentiviralen Vektoren wurden alle für die viralen Strukturproteine kodierenden Regionen aus dem Genom entfernt (replikationsinkompetent), so dass der Vektor selbst keine viralen Proteine produzieren kann. An Stelle der deletierten Sequenzen wurde das Ad5 E1A Protein oder Varianten des Ad5 E1B-55K-Proteins eingesetzt. Die Produktion der lentiviralen Partikel erfolgte mit Hilfe der Zelllinie HEK 293T, die mit dem jeweiligen das Fremdgen tragende Expressionsplasmid LEGO-iCer2 oder LEGO-iV2 sowie den für die Verpackung erforderlichen Plasmiden pCMV-VSV-G, pMDLg/pRRE und pRSV-Rev kotransfiziert wurde. Die HIV-1 (*Human Immunodeficiency Virus-1*) ableiteten Gene gag (*groupspecific-antigen*; kodiert für die Nukleocapsidbestandteile p7, p17 und p24) und pol (*polymerase*; kodiert für die Reverse Transkriptase, Integrase und Protease) gewährleisten die Verpackung der lentiviralen Partikel (Beyer *et al.*, 2002). pCMV-VSV-G ist ein Plasmid, das sich von VSV (*vesicular stomatitis virus*) ableitet und für das Glykoprotein der VSV-Hülle kodiert (Beyer *et al.*, 2002). Das G-Protein des VSV benutzt einen Phosphattransporter als Rezeptor, wodurch das Virus in der Lage ist,

eine spezies- und gewebsübergreifende Infektion von Zellen zu ermöglichen. Das Plasmid pRSV-Rev kodiert für das Rev-Protein (*reverse transcriptase*), welches in einem Vektorsystem zur Sicherstellung des RNA-Transports verwendet wird (Dull *et al.*, 1998) Die HEK 293T-Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von etwa 50% in 150 mm-Zellkulturschalen ausgesät. Vor der Transfektion wurde 1 ml OptiMEM (GIBCO) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Anschließend wurden 7,5 µg des entsprechenden LEGO-Vektors (iCer2, iV2), 2,0 µg pCMV-VSV-G, 3,8 µg pMDLg/pRRE, 2,0 µg pRSV-Rev sowie 90 µl PEI zugegeben. Die Komponenten wurden gut durchmischt und 30 min bei RT inkubiert. Bevor der DNA-PEI Mix zugegeben werden konnte, wurde das Kulturmedium durch 12,5 ml vorgewärmtes OptiMEM ersetzt. Nach 6-8 h Inkubation wurde dieses wieder gegen Vollmedium (DMEM, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin) mit 20 mM Hepes ersetzt. Am dritten Tag nach der Transfektion wurden die lentiviralen Partikel mit dem gewünschten Fremdgen (Ad5 E1A, Ad5 E1B-55K), die von den HEK293T-Zellen produziert wurden und sich im Überstand befanden, geerntet. Dazu wurde das Medium mit einer Spritze aufgezogen, steril filtriert (Porengröße: 0,45 µm) um Zelltrümmer abzutrennen, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

4.2.4.3.2 Titerbestimmung rekombinanter Lentiviruspartikel

Um die Infektionseffizienz der Lentivirus Suspensionen zu bestimmen wurden zunächst HEK 293T-Zellen (5×10^4) auf einer 24-well Zellkulturplatte ausgesät. Nach Absetzen der adhärennten Zellen auf dem Kulturplattenboden (5-6 h) wurde das Medium abgezogen und durch 0,5 ml Kulturmedium mit Polybren (8 µg/ml; Sigma) ersetzt. Für jeden zu testenden Virus wurden je zwei Vertiefungen mit 10 µl und je zwei mit 100 µl Virussuspension behandelt. Eine unbehandelte Vertiefung diente als Negativkontrolle. Am nächsten Tag wurde das Infektionsmedium durch Vollmedium ersetzt. Drei Tage nach Infektion wurde das Medium von den Zellen abgezogen und die Zellen nach einem Waschschrift mit sterilem PBS, mit 500 µl Trypsin (PAA) von der Schalenoberfläche gelöst. Die enzymatische Reaktion konnte mit Zugabe von 0,5 ml Vollmedium (DMEM, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin) gestoppt werden. Die abgelösten Zellen wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (2000 UpM, 3 min; Kühlzentrifuge 5417 R, Eppendorf GmbH). Das Pellet konnte in 0,2 ml sterilem PBS resuspendiert und in ein Rundbodenröhrchen mit Filterdeckel

(Falcon) überführt werden, wobei die Suspension durch den Filter gepresst wurde. Die Proben wurden bis zur Analyse mit dem Durchflusszytometer (*FACS*, Canto) auf Eis gelagert. Der Virustiter konnte aufgrund des Anteils transduzierter fluoreszierender Zellen bestimmt werden.

4.2.4.3.3 *Infektion von Säugerzellen mit lentiviralen Partikeln*

Zur Infektion wurden die Zellen zu einer Konfluenz von 50-70% in einer *6-well* Zellkulturschale ausgesät. Unmittelbar vor der Infektion wurde das Nährmedium auf Infektionsmedium (DMEM, 10% FKS, Polybren 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gewechselt. 10^5 virale Partikel wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt) pipettiert und mit Nährmedium (DMEM, 10% FKS, Polybren 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) auf 1,5 ml aufgefüllt und zu die Zellen gegeben. Nach 6-8 h konnte das Infektionsmedium wieder durch Vollmedium (DMEM, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin) ersetzt werden. Je nach Versuchsansatz konnten die Zellen nach 24-72 h geerntet (4.2.5) oder weiterkultiviert werden.

4.2.5 **Ernte von Säugerzellen**

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

4.2.6 **Transformation primärer Nagerzellen mit Ad-Genprodukten**

Dazu wurden primäre Rattennierenzellen, die zwei Tage vor Versuchsbeginn kultiviert wurden (4.2.2), auf 100 mm-Petrischalen mit Vollmedium (DMEM, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin) ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen wie unter 4.2.4.3.3 beschrieben transduziert. Nach etwa drei Wochen starben die meisten nicht transduzierten Zellen ab, wohingegen Zellen, in denen die adenoviralen Genprodukte exprimiert wurden, zu mehrschichtigen Zellkolonien (*Foci*) auswuchsen. Diese

konnten mit einer Kristallviolett-Färbelösung gefärbt und anschließend ausgezählt werden. Dabei bildet die Anzahl der *Foci* ein Maß für die Effizienz mit der zelluläre und virale Onkogene den Transformationprozess initiieren können.

Kristallviolett-Färbelösung		Kristallviolett	1% (w/v)
		Methanol	25% (v/v)

4.2.7 Herstellung stabiler *knock-down* Zelllinien

Stabile *knock-down* Zelllinien wurden für diese Arbeit aus humanen H1299- und A549-Zellen generiert. Dazu wurden diese Zellen auf *6-well* Kulturplatten ausgesät und mit einer shRNA gegen das humane zelluläre Daxx Protein nach der PEI-Methode (4.2.4.1) transfiziert. Die shRNA wurde gegen die Nukleotidsequenz 5'GGAGTTGGATCTCT CAGAA3' auf dem kodierenden DNA-Strang an Nukleotidposition *nt* 626–643 von Daxx generiert (Michaelson *et al.*, 2003). 24 h nach der Transfektion wurde dem Nährmedium der transfizierten Zellen 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Puromycin (Sigma) zugesetzt. Drei Tage nach Transfektion wurden die Zellen im Verhältnis 1:30 gesplittet und auf 150 mm-Petrischalen weiter kultiviert. Das Nährmedium mit zugesetztem Puromycin wurde alle 3-4 Tage gewechselt, um die Selektion der stabil transfizierten Zellklone zu unterstützen. 3-4 Wochen nach der Transfektion konnten monoklonale Zellklone isoliert werden. Dazu wurde das Medium entfernt, um die Zellen mit sterilem PBS zu waschen. Zur Isolierung einzelner Zellklone (monoklonal) wurden sterile Glaszylinder (Nunc; Durchmesser 5 mm) verwendet, deren Unterseite mit Hilfe einer sterilen Pinzette zuerst in sterile Vaseline getaucht und auf diese Weise flüssigkeitsdicht auf die zu isolierenden Zellklone gesetzt wurden. In die Glaszylinder wurde dann 50 μl Trypsin/EDTA-Lösung (PAA) pipettiert. Nach einigen Minuten konnten die abgelösten Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt werden, in die 50 μl Vollmedium (DMEM, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin) vorgelegt worden war. Nach anschließender Zentrifugation (5000 UpM, 3 min, RT; Kühlzentrifuge 5417 R, Eppendorf GmbH) wurden die Zellen in geeigneten Zellkulturschalen kultiviert und als Zelllinien etabliert.

4.3 Adenoviren

4.3.1 Herstellung von Viruspartikeln aus DNA

Mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *PacI* wurde der bakterielle Anteil von den adenoviralen DNA-Bakmiden entfernt. Die linearisierte DNA wurde mit $1/10$ Vol. 3M NaOAc und 1 Vol. Isopropanol gefällt und je 8 μ g gespaltene Bakmid-DNA pro 50 mm-Petrischale in 2E2-Zellen nach der Liposomen-Methode (4.2.4.2) transfiziert. Nach circa 16 h im Brutschrank wurde das Medium gewechselt. Die transfizierten Zellen wurden solange weiterkultiviert bis sie sich von der Unterlage ablösten (jedoch maximal fünf Tage). Noch adhärente Zellen wurden mit einem Zellschaber abgeschabt, bei 2000 UpM für 5 min pelletiert (Multifuge 3S-R, Thermo), mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend in 5 ml DMEM ohne Zusätze durch viermaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C im Wasserbad lysiert und abermals zentrifugiert (4500 Upm bei RT für 10 min; Multifuge 3S-R, Thermo). Mit dem erhaltenen Überstand wurde erneut eine Petrischale reinfiziert (4.3.4). Dieser Vorgang wurde solange wiederholt (in der Regel zwei- bis fünfmal) bis sich die infizierten Zellen alleine vom Boden ablösten. Die Zellen wurden dann, wie oben beschrieben, geerntet, gewaschen und lysiert. Mit dem erhaltenen Überstand wurde nun eine 150 mm-Zellkulturschale infiziert. Da im Überstand bereits eine beträchtliche Menge an Adenoviren enthalten war, lösten sich die Zellen bald nach der Infektion vom Kulturgefäßboden ab und der Überstand konnte nach der Ernte und Lyse für die Herstellung hochtitriger Virusstocks (4.3.2) benutzt werden.

4.3.2 Herstellung und Lagerung hochtitriger Virusstocks

Zur Gewinnung hochtitriger Virusstocks wurden mehrere 150 mm-Zellkulturschalen entweder mit einer *moi* von 5 oder mit dem Überstand aus 4.3.1 infiziert. Etwa drei Tage nach Infektion war ein deutlicher zytopathischer Effekt sichtbar, das Medium verfärbte sich gelblich und die Zellen lösten sich von der Unterlage. Da 90% der produzierten Viren zellassoziiert bleiben (Jakoby *et al.*, 1979) wurden die Zellen von der Unterlage abgeklopft und fünf Minuten bei 2000 Upm zentrifugiert (Multifuge 3S-

R, Thermo). Das Pellet wurde in 5 ml PBS gewaschen und anschließend erneut zentrifugiert (2000 UpM, 5 min; Multifuge 3S-R, Thermo). Das Zellpellet, das man aus fünf 150 mm großen Zellkulturschalen erhalten hatte, wurde in 4 ml DMEM ohne Zusätze resuspendiert und die Zellen durch viermaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C lysiert. Zur Entfernung der Zelltrümmer wurde 15 min bei 4500 UpM zentrifugiert (Multifuge 3S-R, Thermo). Anschließend wurde der Überstand abgenommen, mit 87%igem Glycerin (steril; 10% Endkonzentration; AppliChem) versetzt und austitriert (4.3.3). Die hergestellten Stocks können bei -80 °C aufbewahrt werden.

4.3.3 Titerbestimmung von Virusstocks

Der Titer der verwendeten Virusstocks wurde mit Hilfe von fluoreszenzbildenden Einheiten (*fluorescence forming unit*, ffu) bestimmt. Diese Methode konzentriert sich auf die frühen Infektionsereignisse, repräsentiert durch die immunhistochemische Bestimmung des frühen adenoviralen E2A-Proteins (DBP). Dazu wurden je 4×10^5 HEK 293-Zellen in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (*6-well* Schale) ausgesät. 24 h später wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Virusstockverdünnungen (10^{-3} bis 10^{-6} in DMEM ohne Zusätze) infiziert. Die Zellen wurden dann 2 h bei 37 °C im Brutschrank (Heraeus) inkubiert und währenddessen alle 15 min vorsichtig geschwenkt, um eine gleichmäßige Virusadsorption zu gewährleisten. Anschließend wurde das Infektionsmedium abgenommen, die Zellen mit 3 ml/Vertiefung angereichertem Medium (DMEM, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin) überschichtet und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. 24 h nach der Infektion (h p.i.) wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml/Vertiefung eiskaltem Methanol für 15 min bei -20 °C fixiert (4.6.6.1). Danach wurde der Alkohol abgesaugt und die *6-well* Schale offen bei RT getrocknet. Für die anschließende immunhistochemische Färbung wurden die Zellen eine Stunde mit 2 ml/Vertiefung TBS-BG blockiert, 2 h bei RT beziehungsweise über Nacht bei 4 °C mit einer 1:10 Verdünnung des Antikörpers B6-8 in TBS-BG (1 ml/Vertiefung) inkubiert, erneut dreimal mit TBS-BG (2 ml/Vertiefung) für je 5 min gewaschen und anschließend mit je 1 ml/Vertiefung der zweiten Antikörper-

verdünnung (Alexa™ 488 Anti-Maus; 1:1000 in TBS-BG) für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde der Sekundärantikörper abgenommen, abermals dreimal mit TBS-BG gewaschen und mit 1 ml TBS-BG versetzt. Die so vorbereiteten Zellen konnten anschließend mit dem Immunfluoreszenzmikroskop (Leica DMIL) ausgezählt werden. Aus der pro Gesichtsfeld ermittelten Zahl infizierter Zellen, konnte unter Berücksichtigung der Zellzahl und der Verdünnungsstufe auf die Zahl der infektiösen Partikel pro ml zurückgerechnet werden.

TBS-BG	Tris/HCl, pH 7,6	20 mM
	NaCl	137 mM
	HCl	3 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
	Tween 20	0,05%
	Natriumazid	0,05%
	Glycin	5 mg/ml
	BSA	5 mg/ml

4.3.4 Infektion von Säugerzellen mit Adenoviren

Für die Infektion wurden Zellen so ausgesät, dass sie am nächsten Tag subkonfluent (60–80%) gewachsen waren. Die Zellen wurden nach Absaugen des Mediums mit sterilem PBS gewaschen. Für die Infektion wurde die entsprechende Menge an Virus (moi zwischen 1 und 200) mit dem geeigneten Volumen Medium (DMEM) ohne Zusätze vermischt und auf die Zellen gegeben. Für die Infektion einer Zellkulturschale mit sechs Vertiefungen benötigte man ein Gesamtvolumen von 1 ml, für Petrischalen wurden 6 ml und für die Infektion einer 150 mm großen Zellkulturschale wurden 10 ml Gesamtvolumen benötigt. Die Zellen wurden dann für 2 h bei 37 °C inkubiert und alle 15 min leicht geschwenkt, um eine gleichmäßige Adsorption der Viren zu ermöglichen. Anschließend wurde die Infektionslösung abgenommen und die Zellen mit frischem Vollmedium (DMEM, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin) überschichtet. Die infizierten Zellen wurden je nach Versuchsansatz 6-72 h entsprechend weiter inkubiert.

4.3.5 Bestimmung und Ausbeute an Virusnachkommen

Um die Anzahl der Nachkommenviren zu bestimmen, wurden Zellen (A549-, H1299- bzw. Hep-Zellen) in Petrischalen wie unter 4.3.4 beschrieben mit Ad5 infiziert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. Dazu wurden die Zellen mit Hilfe eines Plastikspatels vom Boden der Petrischale abgeschabt, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (2000 UpM, 3 min; Multifuge 3S-R, Thermo). Das Zellpellet wurde mit 5 ml sterilem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (2000 UpM, 3 min; Multifuge 3S-R, Thermo). Nun konnte das Pellet in 300-500 µl DMEM ohne FKS und Penicillin/Streptomycin resuspendiert und die Zellen durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C lysiert werden. Zur Entfernung der Zelltrümmer wurde erneut zentrifugiert (4500 UpM, 10 min; Multifuge 3S-R, Thermo). Der virushaltige Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und konnte bei 4°C gelagert werden. Die Zahl der infektiösen Partikel im Überstand konnte wie unter 4.3.3 angegeben bestimmt werden. Aus dieser Zahl, der Verdünnung und der Anzahl der in dem Versuch eingesetzten Zellen konnte die Zahl der Nachkommenviren berechnet werden.

4.3.6 Inhibition des zellulären 26S Proteasom

Das 26S Proteasom wird aus zwei Untereinheiten gebildet. Die zentrale 20S-Core-Einheit, besteht aus 4 Ringen und besitzt proteolytische Aktivität. Die jeweils an den Enden sitzenden 19S-Einheiten haben eine regulatorische Aufgabe. Die 4 Ringe der Core-Einheit lassen sich in eine zentrale β -Einheit und zwei periphere α -Einheiten unterteilen. Diese Einheiten bestehen wiederum aus sieben Untereinheiten ($\alpha 1$ - $\alpha 7$, $\beta 1$ - $\beta 7$), die Ähnlichkeiten mit verschiedenen Enzymen aufweisen. $\beta 2$ besitzt Trypsin-ähnliche, $\beta 5$ Chymotrypsin-ähnliche und $\beta 1$ Glutamylpeptidylhydrolytische (PGPH) Aktivität (Hershko *et al.*, 1998). Das Tripeptidaldehyd MG-132 (Sigma) hemmt reversibel $\beta 1$ - und $\beta 2$ -Untereinheiten des Proteasoms und wirkt zusätzlich auf andere Proteasen der Zelle, wie Calpain und Cathepsin B. Zur Proteasomeninhibition wurde eine Transfektion (4.2.4.) oder Infektion (4.3.4) mit den entsprechenden Zellen

durchgeführt. Vor der Zelleernte wurde das Medium abgezogen und durch DMEM ohne Zusätze unter Zugabe von MG-132 (Endkonzentration 20 mM) 6-8 h weiterinkubiert. Da dieser Inhibitor zuvor in DMSO gelöst wurde, ist es wichtig die Kontrollzellen ebenfalls mit DMSO zu behandeln um eine Aussage über die Proteasomeninhibition in MG-132 behandelten und unbehandelten Zellen treffen zu können. Anschließend wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und über SDS-Gelelektrophorese sowie *Western Blot* weiteranalysiert.

4.4 DNA-Klonierungstechniken

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

Zur analytischen Isolierung kleiner Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde ein von Beck und Mitarbeiter modifiziertes Verfahren der alkalischen Lyse eingesetzt (Beck *et al.*, 1993). Dabei wurde eine 1,5 ml Übernachtskultur bei RT für 1 min bei 13 000 UpM (Kühlzentrifuge 5417 R, Eppendorf GmbH) abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 300 µl Lösung A resuspendiert. Die Suspension wurde dann mit 300 µl Lösung B versetzt, vorsichtig geschwenkt, 5 min bei RT inkubiert, 300 µl Lösung C zugegeben, erneut 5 min bei RT inkubiert und anschließend ebenfalls bei RT für 10 min bei 13 000 UpM (Kühlzentrifuge 5417, Eppendorf GmbH) zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt und die DNA 30 min bei 13 000 UpM (Kühlzentrifuge 5417, Eppendorf GmbH) gefällt. Der Überstand wurde abgesaugt und das DNA-Präzipitat mit 1 ml EtOH_{75%} gewaschen, getrocknet und in 50 µl H₂O_{bid} gelöst. Die so isolierte DNA konnte für Restriktions- und Sequenzanalysen eingesetzt werden.

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

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

4.4.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde mit Hilfe des *NanoDrop1000* (Thermo Scientific), sowie mit dem Spektralfotometer *smart spec plus* (BioRad) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die zu analysierende DNA-Lösung wurde entweder direkt auf eine Meßplattform pipettiert (*NanoDrop1000*) oder in eine Quarzküvette (1cm Schichtdicke) gegeben und ein UV-Absorptionsspektrum über einen festgelegten Wellenlängenbereich aufgenommen. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Absorption von 1,0 im Absorptionsmaximum bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml. Für einzelsträngige Oligonukleotide gilt die Näherungsformel $1 \text{ OD}_{260} = 33 \text{ µg/ml}$.

4.4.3 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen beruht auf der unterschiedlichen Wandergeschwindigkeit der Nukleinsäure im elektrischen Feld in Abhängigkeit von der Fragmentlänge. Zur Herstellung von Agarosegelen wurde eine entsprechende Menge LE - Agarose (Biozym) in einem Mikrowellenherd (Siemens) in 1 x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und zur späteren Färbung der DNA 50 ng/ml Ethidiumbromid-Stammlösung hinzugefügt. Die leicht abgekühlte Agarose-Lösung wurde dann in eine vorbereitete Flachbettgelapparatur gegossen. Die DNA-Proben wurden mit jeweils $\frac{1}{10}$ Vol. Auftragspuffer versetzt und auf das verfestigte Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 5–10 V/cm. Analytische Gele wurden mit Hilfe des *G-Box system*-UV-Transilluminators (Syngene) und der *Gene tools* Software (Syngene) bei einer Wellenlänge von 312 nm visualisiert und dokumentiert. Präparative Gele wurden zur Schonung der DNA bei langwelligem UV-Licht (365 nm) detektiert, und entsprechende DNA-Banden ausgeschnitten. Um die DNA-Schäden durch UV-Licht weiter zu minimieren, insbesondere bei großen DNA-Fragmenten wie bei Ad5-Bakmiden, wurde bei präparati-

ven Gelen zusätzlich 1 mM Guanosin in die Gellösung eingebracht.

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

4.4.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen erfolgte entweder mit Hilfe des *Qiagen Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers oder über ein alternatives Verfahren, das insbesondere für die Isolierung von Bacmid-DNA-Fragmenten herangezogen wurde. Dabei wurde ein Agaroseblock mit der zu präparierenden DNA-Bande zunächst unter langwelligem UV-Licht (365 nm) aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend für 2 h bei RT und 20000 UpM im SS34-Rotor (*Super T 21*, Sorvall) zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde dann mit $1/10$ Vol. 3M NaOAc und 1 Vol. Isopropanol gefällt, das DNA-Pellet in 40 μ l 10 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgenommen und die Konzentration und Qualität der isolierten DNA über erneute Agarose-Gelelektrophorese (4.4.3) eines Aliquots mit Hilfe des *G-Box Systems* (Syngene), abgeschätzt.

4.4.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

4.4.5.1 Standard-PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR; Saiki *et al.*, 1988) ist ein Verfahren zur Amplifikation definierter Nukleinsäuresequenzen *in vitro*, wobei die Spezifität der Reaktion durch die Wahl der zugesetzten Starter-Oligonukleotide sichergestellt wird. Für einen 50 μ l Standard-Reaktionsansatz wurden 50–100 ng DNA, je 0,2 μ M der entsprechenden Oligonukleotide, je 1 mM dATP, dTTP, dCTP und

dGTP (New England Biolabs), 5 µl 10 x PCR-Puffer (Omnilab) und 0,5 µl thermostabile *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl; Omnilab) eingesetzt. Dieser Ansatz wurde in dünnwandigen 0,2 ml Reaktionsgefäßen (Biozym) in einem *FlexCycler* (Analytic Jena) nacheinander wie folgt inkubiert: Aufschmelzen der DNA bei 95 °C, Hybridisierung der Oligonukleotide an die Zielsequenz bei 55-70 °C und ein Polymerisationsschritt bei 72 °C. Dieser Zyklus wurde 20 bis 30 mal durchlaufen, gefolgt von 10 min Inkubation bei 72 °C um 3'-Enden nicht vollendeter PCR-Produkte aufzufüllen, und im Anschluss daran auf 4 °C abgekühlt. 5 µl der so amplifizierten DNA wurden auf einem Agarosegel elektrophoretisch (4.4.3) aufgetrennt und unter UV-Licht hinsichtlich Fragmentgröße und Ausbeute mit Hilfe des *G-Box Systems* (Syngene) überprüft.

4.4.5.2 Zielgerichtete *in-vitro* Mutagenese mittels PCR

Die *in-vitro*-Punktmutagenese rekombinanter Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) nach den Anweisungen des Herstellers. Dazu wurde ausgehend von zwei komplementären Oligonukleotiden, welche die gewünschten Mutationen enthielten, das gesamte Plasmid amplifiziert. Das Oligonukleotid sollte über eine Fragmentlänge von 25-45 Basen und über eine Schmelztemperatur über 78 °C verfügen. Die eingeführte Mutation sollte in der Mitte der Primersequenz enthalten sein, welche zusätzlich mit einem GC-reichen Abschnitt beginnen und enden sollte. Die Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden von der Firma Metabion oder Alpha DNA hergestellt und in die PCR zu einer Endkonzentration von 125 ng eingesetzt. Die Mutagenese wurde in 0,2 ml PCR Reaktionsgefäßen (Biozym) angesetzt. Der Mix bestand aus 5 µl des 10x Reaktionspuffers (Stratagene), jeweils 1 µl des *forward* und *reverse* Primers, 1 µl dNTP-Mix (Desoxynukleotidphosphat-Mix; dATP, dGTP, dCTP, dTTP; New England Biolabs) und dem DNA Fragment, in welches die Mutation eingeführt werden sollte. Der Ansatz wurde dann mit 1 µl *Pfu Ultra II* DNA-Polymerase (Stratagene) versetzt und mit H₂O_{bid} auf ein Gesamtvolumen von 50 µl gebracht. Die PCR wurde in 12-14 Zyklen in einem *FlexCycler* (Analytic Jena) durchgeführt (Aufschmelzen der DNA bei 95 °C, Hybridisierung der Oligonukleotide an die Zielsequenz bei 55 °C und ein

Polymerisationsschritt bei 72 °C). Anschließend wurde 3 h bei 37 °C mit 1 µl des Restriktionsenzym *DpnI* (New England Biolabs) verdaut, um methylierte Elternstrang-DNA zu beseitigen. 5 µl der mutagenisierten DNA wurden auf einem Agarosegel elektrophoretisch (4.4.3) aufgetrennt und unter UV-Licht hinsichtlich Fragmentgröße und Ausbeute mit Hilfe des *G-Box Systems* (Syngene) überprüft. Resultierende Ziel-Plasmide wurden dann chemisch in *E. coli* Stämme transformiert (4.1.2.2).

4.4.5.3 PCR zum Nachweis der Virusreplikation

Aus dem Gesamtzellextrakt infizierter Zellen wurden gleiche Mengen an Zellysate (entsprechend der Proteinkonzentration) entnommen, mit Tween-20 (Endkonzentration 0,5%; Merck) und Proteinase K (Endkonzentration 100 µg/ml; Invitrogen) versetzt und mit H₂O_{bid} auf 24,5 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde nun 1 h im Heizblock (Eppendorf Thermomixer comfort) bei 55 °C inkubiert. Nach 10 min Inaktivierung der Proteinase K bei 100 °C wurde eine Standard-PCR (Denaturierung: 30 s bei 95 °C, Hybridisierung: 1 min bei 55 °C und Polymerisation: 2 min bei 72 °C) mit 20 Zyklen durchgeführt. Als Primer dienten die zwei Oligonukleotide E1B bp2043 fwd (#64) und E1B 361-389 rev (#110), die ein 389 bp langes Fragment aus dem Ad5 E1B-55K-Gen amplifizieren. Die PCR-Produkte wurden in einem 1% igen Agarosegel analysiert (4.4.3) und mit Hilfe des *G-Box Systems* und der *Gene tools* Software (Syngene) densitometrisch ausgewertet.

4.4.6 Klonierung von DNA-Fragmenten

4.4.6.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme

Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen New England Biolabs und Roche bezogen und mit den entsprechenden 10-fach Puffern gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt. Um Pufferunverträglichkeiten bei Spaltungen mit mehreren Enzymen zu umgehen, wurde die DNA gegebenenfalls nach jedem einzelnen Verdau mit 1/10 Vol. 3 M NaOAc und 1 Vol. Isopropanol gefällt und erneut in H₂O_{bid} aufgenommen. Für analytische Spaltungen wurden in der Regel 0,5–1 µg DNA sowie

je 3–10 U Restriktionsenzym eingesetzt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Präparative Restriktionsspaltungen enthielten 0,5–20 µg DNA und je 50 U Enzym, bei einer Inkubation bei 37 °C für mindestens 2 h. Bei der Klonierung adenoviraler Bacmid-DNA wurde je 1 µg DNA mit 25 U Restriktionsenzym gespalten (*SwaI* bei 30 °C für 20 h; *BstZ17I* bei 37 °C für 4 h). Zu spaltende PCR-Produkte wurden nach der PCR-Reaktion zunächst über NaOAc/Isopropanolfällung von nicht-inkorporierten Oligonukleotiden und dNTPs gereinigt und konzentriert, bevor sie über Restriktionsenzymsspaltung für die Klonierung vorbereitet werden konnten. Nach der Spaltung wurden die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt (4.4.3) und gegebenenfalls aus dem Gel gereinigt (4.4.4). Anschließend kann die DNA zur Transformation in *E. coli* eingesetzt werden (4.1.2).

4.4.6.2 Identifizierung rekombinanter Klone

Für die DNA-Sequenzierung wurden 300 ng Plasmid-DNA/500 ng Bacmid DNA und 6 pmol/10 pmol eines entsprechenden Oligonukleotids mit H₂O_{bid} auf ein Endvolumen von 8 µl aufgefüllt. Die DNA-Sequenzierungen dieser Arbeit wurden von der Firma *GeneArt* durchgeführt.

4.5 RNA-Techniken

4.5.1 Vermeidung RNase-induzierten RNA-Abbaus

Ribonukleasen (RNasen) sind sehr stabile und aktive Enzyme, die selbst in geringen Konzentrationen und in kürzester Zeit RNA abbauen können. Um den Abbau der RNA zu vermeiden, wurden beim Arbeiten mit RNA spezielle Vorkehrungen getroffen. Gegenstände aus Glas und Metall wurden in einem Ofen für 12 h bei 160 °C gebacken, ein Vorgang der RNasen irreversibel denaturiert. Alle Chemikalien wurden in H₂O_{bid} gelöst und mit DEPC auf eine Endkonzentration von 0,1% (v/v) gebracht, soweit das DEPC nicht mit den entsprechenden Reagenzien interferiert. Die DEPC-haltigen Lösungen wurden über Nacht bei RT inkubiert und am nächsten Tag autoklaviert. Dabei reagiert das DEPC mit den Aminogruppen der RNasen und

inaktiviert diese irreversibel. Durch das Erhitzen während des Autoklavierens zersetzt sich überschüssiges DEPC und stört nicht mehr in nachfolgenden Prozessen.

4.5.2 Präparation von RNA aus Säugerzellen

Für die Isolierung von RNA aus dem Zellpellet erfolgte mit Hilfe des *RNeasy*[®] Mini-Systems (Qiagen) nach Anweisung des Herstellers.

4.5.3 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die gereinigte RNA wurde anschließend im fotospektrometrisch (*NanoDrop 1000*, *Thermo Scientific*) bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen. Dabei entspricht eine Absorption von 1,0 bei 260 nm einer Konzentration von 40 µg/ml.

4.5.4 Quantitative *Real-time* PCR (qRT-PCR)-Analyse zur Ermittlung der mRNA Syntheserate

Subkonfluente Zellen wurden ausgesät und am nächsten Tag mit H5pg4100 Wildtypvirus infiziert (moi 20). 12 und 36 h p. i. wurden die Zellen geerntet. Gesamt-RNA wurde nach Angaben des Herstellers mit Trizol (Invitrogen) isoliert. Anschließend konnte die Konzentration der Gesamt-RNA ermittelt werden (4.5.3), um 1 µg RNA mittels Reverser Transkriptasereaktion in cDNA umzuschreiben. Dies erfolgte nach Angaben des Herstellers Roche mit dem *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Sample Kit*. Die *Real-time* PCR wurde mit dem Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia) unter Verwendung der transkribierten cDNA Stränge und der entsprechenden Oligonukleotide. Um die *Real-time* PCR durchzuführen, wurden 1/100 cDNA-Verdünnung, 12,5 µl *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) und 10 µM je Primer verwendet (PCR-Programm: 10 min at 95 °C, 55 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 55 to 62 °C, je nach eingesetztem Primer Set, and 30 s at 72 °C). Der C_t Wert wurde aus drei unabhängigen Experimenten sowie dem Verhältnis der viralen RNA zu den zellulären 18S rRNA Mengen ermittelt. Durch Schmelzkurvenanalyse

wurde die Identität der PCR Produkte sichergestellt.

4.6 Protein-Techniken

4.6.1 Herstellung von Gesamtzellextrakt aus Säugerzellen

Die bei -20 °C gelagerten Zellen (4.2.5) wurden zunächst auf Eis aufgetaut, frisch geerntete Zellen wurden direkt mit einer geeigneten Menge gekühltem NP-40 oder RIPA *light*-Lysepuffer mit zugesetzten Proteaseinhibitoren (PMSF 1 mM, Aprotinin 10 U/ml, Leupeptin 1 µg/ml, Pepstatin 1 µg/ml und DTT 1% (v/v)) resuspendiert und 60 min auf Eis inkubiert. Um einen vollständigen Zellaufschluss zu gewährleisten, wurden die Zellysate mit Ultraschall (30 s, *output* 0,45-0,6 Impulse/s; Branson Sonifier 450) behandelt, wobei die Reaktionsgefäße (Sarstedt) stets auf Eis gelagert wurden. Die Zellysate wurden anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (11000 UpM, 3 min, 4 °C; Kühlzentrifuge 5417R, Eppendorf GmbH), um größere Zellfragmente abzutrennen. Der Überstand wurde, für weitere Experimente in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert.

NP-40	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	Nonidet P-40	0,15% (v/v)
	Proteaseinhibitoren (siehe Text)	frisch zugeben
RIPA <i>light</i> -Lysepuffer	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	Nonidet P-40	1% (v/v)
	SDS	0,1% (w/v)
	Triton-X 100	0,1% (v/v)
	Proteaseinhibitoren (siehe Text)	frisch zugeben

4.6.2 Quantitative Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration löslicher Proteine einer Probe wurde mit Hilfe des *Protein-Assays* (BioRad) bestimmt. Dieses Testverfahren, das auf der Proteinquantifizierung nach Bradford beruht (Bradford, 1976), misst die auftretende Absorptionzunahme bei

595 nm, nachdem die vorhandenen Proteine an das chromogene Substrat dieses Testsystems gebunden haben. Die Proteinkonzentration in der Probe lässt sich durch Vergleich der gemessenen OD_{595} mit den Werten einer Eichkurve ermitteln. 1 μ l der zu bestimmenden Proteinprobe bzw. 1 bis 20 μ g des Eichproteins BSA (Rinderserumalbumin; AppliChem) wurden in Polystyrol-Küvetten (Sarstedt) mit H_2O_{bid} jeweils auf ein Gesamtvolumen von 800 μ l aufgefüllt und nach Zugabe von 200 μ l Färbereagenz 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm fotometrisch gegen den Nullwert (800 μ l H_2O_{bid} + 200 μ l Färbereagenz) bestimmt.

4.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine in Gegenwart eines hohen SDS-Überschusses elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dabei lagert sich das negativ geladene SDS in konstanten Gewichtsverhältnissen an die Proteine an und kompensiert deren positive Ladung so, dass die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine zur Anode allein durch deren Größe bestimmt wird. Die Qualität der Proteinauftrennung wird in diesem durch Laemmli etablierten Verfahren durch die Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems gesteigert, wobei die Proteine zunächst in einem niedrigprozentigen Sammelgel konzentriert werden und von dort gemeinsam in das Trenngel einwandern (Laemmli, 1970). Der Aufbau der verwendeten Gelapparaturen (Biometra) und das Gießen der Gele erfolgte entsprechend den Angaben der Hersteller. Die genaue Zusammensetzung der benötigten Gellösungen ist unten aufgeführt (Harlow *et al.*, 1988). Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proteinproben mit dem gleichen Volumen eines zweifach konzentrierten SDS-Probenpuffers (Sambrook *et al.*, 1989) versetzt und 5 min im Heizblock (Eppendorf Thermomixer comfort) bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 15 mA pro Gel in TGS-Puffer bis die Bromphenolblau-Bande das Ende des Gels erreichte. Im Anschluss an die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese konnten die aufgetrennten Proteine über *Western Blot*-Analyse (4.6.4) detektiert werden.

METHODEN

30 % Acrylamid-Stammlösung	Acrylamid	29% (w/v)
	N, N'Methylenbisacrylamid	1% (w/v)
Sammelgel (5 %)	Acrylamid-Stammlösung	17% (v/v)
	Tris/HCl, pH 6,8	120 mM
	SDS	0,1% (w/v)
	APS	0,1% (w/v)
	TEMED	0,1% (v/v)
	Acrylamid-Stammlösung	27% (v/v)
Trenngel (8 %)	Tris/HCl, pH 8,8	250 mM
	SDS	0,1% (w/v)
	APS	0,1% (w/v)
	TEMED	0,04% (v/v)
	Acrylamid-Stammlösung	40% (v/v)
Trenngel (12 %)	Tris/HCl, pH 8,8	250 mM
	SDS	0,1% (w/v)
	APS	0,1% (w/v)
	TEMED	0,04% (v/v)
	Acrylamid-Stammlösung	50% (v/v)
Trenngel (15 %)	Tris/HCl, pH 8,8	250 mM
	SDS	0,1% (w/v)
	APS	0,1% (w/v)
	TEMED	0,04% (v/v)
	Acrylamid-Stammlösung	50% (v/v)
TGS-Puffer	Tris	25 mM
	Glycin	200 mM
	SDS	0,1% (w/v)
	Tris/HCl, pH 6,8	100 mM
SDS-Probenpuffer	SDS	4% (w/v)
	DTT	200 mM
	Bromphenolblau	0,2% (w/v)
	Glyzerin	20%

4.6.4 Western Blot -Analyseverfahren

Voraussetzung für den immunologischen Nachweis der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine ist die Immobilisierung der Polypeptide auf Nitrozellulose (Protran, Schleicher & Schuell) nach dem *Western Blot*-Verfahren. Der Transfer erfolgte mit Hilfe einer *Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell* (BioRad) nach Anleitung des Herstellers in *Towbin*-Puffer bei einer Stromstärke von 400 mA für 30-150 min, je nach Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins. Zum Überprüfen des Transfers konnten die Proteine auf der Membran mit Ponceau S (Sigma) reversibel angefärbt werden. Zum Entfärben wurde die Membran mit H₂O_{bid} gewaschen. Vor der Inkubation der Nitrozellulose mit einem spezifischen Antikörper wurden die freien Bindungsstellen der Membran durch Inkubation in PBS mit 5% Magermilchpulver (Glücksklee) für 1 h bei

RT oder über Nacht bei 4 °C abgesättigt. Anschließend wurde die Membran in einer Lösung des spezifischen Primärantikörpers (verschiedene Verdünnungen in PBS-Tween mit oder ohne Milchpulverzugabe) für 1 h bei RT inkubiert. Nach der Bindung des primären Antikörpers wurde die Membran dreimal 5 min in PBS-Tween gewaschen und für 1 h in einer 1:10000 Verdünnung eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers geschüttelt. Nach drei weiteren Waschschrritten mit PBS-Tween für je mindestens 5 min folgte die Inkubation des Nitrozellulosemembran mit dem chemilumineszenten Substrat für die HRP-vermittelte Farbreaktion. Für den spezifischen Proteinnachweis wurde das *SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce) verwendet. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip der verstärkten Chemilumineszenz unter Beteiligung des Enzyms HRP und stellt ein nicht radioaktives Nachweisverfahren von hoher Sensitivität dar. In dem hier verwendeten System wird das zyklische Diacylhydrazid Luminol durch die an den Anti-Immunglobulin-Antikörper gekoppelte Peroxidase unter alkalischen Bedingungen oxidiert, was zu einer Lichtemission mit einem Maximum bei 428 nm führt. Chemische Verstärker wie Phenol erhöhen die Lichtintensität um den Faktor 1000 und verlängern den Zeitraum der Emission, so dass eine maximale Intensität 5-20 min nach Einsetzen der Reaktion und eine anschließende Abnahme der Strahlung mit einer Halbwertszeit von 1 h zu beobachten sind. Hierfür wurden nach Abgießen des letzten Waschpuffers die beiden Detektionslösungen nach Angaben des Herstellers 1:1 gemischt und auf den Nitrozellulosefilter gegeben. Nach 5 min Inkubationszeit wurde der Filter in Folie eingeschlagen. Die autoradiographische Detektion des Signals fand während Expositionszeiten zwischen 10 s und 20 min mit einem Röntgenfilm (CEA RP new, medical X-ray film; CEA RP new) statt. Der Film wurde anschließend mit Hilfe eines Entwicklungs- und Fixierautomats (Kodak) entwickelt.

PBS-Tween	Tween-20	0,1% (v/v)
	• in PBS	200 mM
Towbin-Puffer	Tris/HCl, pH 8,3	25 mM
	Glycin	200 mM
	SDS	0,05% (w/v)
	Methanol	20% (v/v)
Ponceau S	Ponceau S	0,2% (w/v)
	Trichloressigsäure	3% (w/v)
	Sulfosalicylsäure	3% (w/v)

4.6.5 Nachweis von Protein-Protein Interaktionen mittels Immunpräzipitation

Das Prinzip der Immunpräzipitation beruht auf der spezifischen Erkennung eines Zielproteins durch einen an eine Sepharose-Matrix gekoppelten Antikörper, was eine Isolierung von Proteinen beziehungsweise Proteinkomplexen ermöglicht. Die Kopplung von Antikörpern aus Maus und Kaninchen erfolgte an Protein A-Sepharose (Sigma), die von Ratten-Antikörpern an Protein G-Sepharose (Sigma). Sowohl Protein A als auch G binden spezifisch an den F_c-Teil von Antikörpern, was eine indirekte Kopplung der Antikörper an die Sepharose-Matrix zur Folge hat. Der an die Sepharose-Matrix gebundene Protein-Antikörper-Komplex kann im Anschluss daran aufgrund des hohen Molekulargewichts der Sepharose durch Zentrifugation sedimentiert werden (6000 UpM, 5 min, 4 °C; Kühlzentrifuge 5417R; Eppendorf GmbH). Gebundene Proteine können daraufhin durch Erhitzen des Präzipitats für 5 min auf 95 °C in einem geeigneten Probenpuffer (Lämmli) wieder in Lösung gebracht werden und anschließend mit Hilfe von SDS-PAGE (4.5.3) aufgetrennt und *Western Blot* (4.6.4) detektiert werden. Durch Koimmunpräzipitation ist es möglich, spezifische Bindungen von Proteinen an das vom Antikörper erkannte Protein nachzuweisen. Dabei ist die Stringenz des eingesetzten Lysepuffers von maßgeblicher Bedeutung. Für einen Ansatz wurden 3 mg lyophilisierte Protein A- oder G-Sepharose in 1 ml Lysepuffer (NP-40 oder RIPA-*light*) eine Stunde bei 4 °C in einem Überkopfschüttler (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) äquilibriert. Die Suspension wurde daraufhin bei 4 °C 5 min bei 6000 UpM abzentrifugiert (Kühlzentrifuge 5417R; Eppendorf GmbH), das Sediment in 1 ml gekühltem Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren (PMSF 1mM, Aprotinin 10 U/ml, Leupeptin 1 µg/ml, Pepstatin 1 µg/ml und DTT 1% (v/v)) gewaschen und entweder in 1 ml Lysepuffer mit 200 µl Hybridomüberstand oder in 1 ml Lysepuffer mit 10–20 µg gereinigtem Antikörper aufgenommen. Die Bindung der Antikörper an die Matrix fand während einer zweistündigen Inkubation bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) statt. Die Suspension wurde daraufhin erneut bei 6000 UpM für 5 min, 4 °C (Kühlzentrifuge 5417R; Eppendorf GmbH) abzentrifugiert, die Sepharose dreimal in 1 ml gekühltem Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren gewaschen, abzentrifugiert (6000 UpM, 5 min, 4 °C;

Kühlzentrifuge 5417R; Eppendorf GmbH) und mit Lysepuffer wieder auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt. Jeder Ansatz dieser Suspension wurde mit der entsprechenden Menge Zellysat (100 - 5000 µg Gesamtprotein) gemischt (4.6.2) und über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) inkubiert. Zur Eliminierung unspezifischer Bindungen der Proteine aus dem Zellysat mit der Sepharose-Matrix wurde der zu untersuchende Zellextrakt vorher mit je 50 µl Pansorbin (Calbiochem) für 2 h auf einem Überkopfschüttler (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) bei 4 °C inkubiert und nach Zentrifugation (6000 UpM, 5 min, 4 °C; Kühlzentrifuge 5417R; Eppendorf GmbH) eingesetzt. Die nach der Immunpräzipitation erhaltene Suspension wurde abzentrifugiert (6000 UpM, 5 min, 4 °C; Kühlzentrifuge 5417R; Eppendorf GmbH), dreimal mit je 1 ml gekühltem Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren gewaschen, zentrifugiert (6000 UpM, 5 min, 4 °C; Kühlzentrifuge 5417R; Eppendorf GmbH) und das Sediment in 15 µl SDS-Probenpuffer (Lämmli) aufgenommen, 5 min bei 95 °C aufgeköcht und anschließend 10 min bei 13000 UpM abzentrifugiert (Kühlzentrifuge 5417R; Eppendorf GmbH). Die Proben konnten nun SDS-PAGE (4.5.3) aufgetrennt und mit Hilfe von *Western Blot* (4.6.4) weiter analysiert werden.

NP-40 (niedrige Stringenz)	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	Nonidet P-40	0,15% (v/v)
	Proteaseinhibitoren (siehe Text)	frisch zugeben
RIPA-light (mittlere Stringenz)	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	Nonidet P-40	1% (v/v)
	SDS	0,1% (w/v)
	Triton X-100	0,1% (v/v)
	Proteasinhitoren (siehe Text)	frisch zugeben

4.6.6 Immunfluoreszenz-Analysen

4.6.6.1 Fixierung mit Methanol

Subkonfluente, adhärenente Zellen wurden in *6-well* Zellkulturschalen auf sterilen Deckgläsern bei 37 °C kultiviert und gegebenenfalls transfiziert (4.2.4) oder infiziert

(4.3.4). Zur Fixierung der Zellen wurde das Medium abgesaugt, die bewachsenen Deckgläser mit PBS gewaschen und für 15 min in eiskaltem Methanol bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen bei RT getrocknet und konnten bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder sofort für die Immunfluoreszenzfärbung (4.6.6.2) weiter verwendet werden.

4.6.6.2 Immunologischer Nachweis

Für die Immunfluoreszenz wurden die Deckgläser auf Parafilm (Pechiney Plastic Packaging) überführt und zur Absättigung unspezifischer Bindestellen 1 h in TBS-BG inkubiert. Nach Entfernen des Überstandes und drei Waschschritten mit PBS wurden pro Deckglas $20\text{ }\mu\text{l}$ Primärantikörper in geeigneter Verdünnung mit PBS zugegeben und 2 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert, um ein Eintrocknen der Antikörperlösung zu verhindern. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte auf die gleiche Weise die Inkubation mit dem sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper, der als 1:200 Verdünnung in PBS verwendet wurde. Zur Anfärbung der DNA-Chromatinkomplexe wurden $0,5\text{ }\mu\text{g/ml}$ dapi (Sigma) zugesetzt. Nichtgebundener Sekundärantikörper wurde durch die folgenden drei Waschschrritte mit PBS entfernt. Die Deckgläser wurden nun mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf einen Objektträger gelegt und mittels *Glow Mounting Medium* (EnerGene) eingebettet. Die Versuchsansätze konnten abgedunkelt bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mehrere Tage bis wenige Wochen gelagert werden. Die weitere Analyse erfolgte mit Hilfe eines DM6000 Immunfluoreszenzmikroskops (Leica) mit digitalem Bildverarbeitungssystem (Leica Application Suite).

TBS-BG	Tris/HCl, pH 7,6	20 mM
	NaCl	137 mM
	KCl	3 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
	Tween 20	0,05% (v/v)
	Natrium-Azid	0,05% (w/v)
	Glycin	5% (w/v)
	BSA	5% (w/v)

4.6.7 Lumineszenz-basierte Reporterversuche

Zur quantitativen Bestimmung von Promotoraktivitäten wurde das *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega) nach Anweisungen des Herstellers verwendet. Die Reporterplasmide pRE-LUC, pGL E1B-LUC und pGalTK-LUC enthalten das *Firefly-Luziferase-Gen* aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* unter der Kontrolle eines p53-abhängigen Promotors (pRE-LUC), des Ad5-E1B-Promotors (pGL E1B-LUC) oder eines Promotors mit Gal4-DNA-Bindungssequenz (pGalTK-LUC). Die Reporterkonstrukte wurden zusammen mit verschiedenen Mengen von Expressionskonstrukten (E1B-55K, Konstrukten mit dem Gen für humanes Daxx oder Fusionskonstrukten mit der Gal4-DNA-Bindungsdomäne) und einem p53-Expressionskonstrukt pC53SN3 (bei pRE-LUC) in p53-negative H1299-Zellen oder Hep shDaxx-Zellen transfiziert. So konnten die Auswirkungen der Transrepressionswirkung des E1B-55K-Proteins auf p53-induzierte Promotoren (pRE-LUC), die Promotoraktivität des E1B-Promotors (pGL E1B-LUC), sowie die Co-Repressorfunktionen von Daxx auf E1B-55K (pGalTK-LUC) untersucht werden. Als interne Kontrolle wurde zusätzlich der Vektor pRL-TK transfiziert, der das *Renilla-Luziferase-Gen* aus *Renilla reniformis* unter Kontrolle des konstitutiven Thymidin-Kinase-Promotors enthält. Beide Luziferasen sind jeweils unter unterschiedlichen Bedingungen aktiv und können somit unabhängig voneinander angeregt und vermessen werden. Die Messung der *Renilla-Luziferase* (pRL-TK) wurde dazu benutzt die verschiedenen Lysate zu normieren und der Wert der Promotoraktivität wurde als Quotient aus *Firefly-Luziferase-Aktivität* zu *Renilla-Luziferase-Aktivität* berechnet. Für die Versuche wurden 5×10^4 H1299-Zellen in 12-well Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag mit 0,5 µg pRL-TK, 1 µg Reporterplasmid (pRE-LUC, pGL E1B-LUC oder pGalTK-LUC), 15 ng pC53SN3 (nur im Falle von pRE-LUC), unterschiedliche Mengen an Konstrukten mit dem Gen für humanes Daxx sowie unterschiedlichen Mengen an E1B-55K-Expressionskonstrukten (basierend auf pcDNA3 für pRE-LUC oder basierend auf pG4 für pGalTK-LUC) mit der PEI-Methode (4.2.4.1) transfiziert. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, 100 µl *passive lysis buffer* (Promega) pro Ansatz auf die Zellen gegeben und 20 min bei RT geschüttelt. Durch Pipettieren wurden die Zellen daraufhin vollständig abgelöst. Alle weiteren Arbeitsschritte zur Ermittlung

der Promotoraktivität wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und die Promotoraktivitäten mit einem Luminometer (Lumat LB 9507, Berthold) bestimmt.

5 Ergebnisse

5.1 Analyse der Interaktion des PML-NB-assoziierten Faktors Daxx mit E1B-55K

Ad5 E1B-55K übernimmt durch die Modulation zellulärer Regulatoren der Zellzykluskontrolle und Apoptose eine zentrale Rolle in der Ad5-vermittelten Transformation primärer Zellen. Zahlreiche Arbeiten beschäftigten sich mit dem Wirkmechanismus der transkriptionellen und post-transkriptionellen Inaktivierung des zellulären Tumorsuppressorproteins p53 durch E1B-55K. Es ist bekannt, dass die E1B-55K-abhängige Sequestration von p53 in perinukleäre Proteinstrukturen sowie die Komplexierung mit E4orf6 und zellulären Faktoren zu einer E3-Ubiquitinligase, die Inaktivierung des Tumorsuppressors zur Folge hat (Cathomen *et al.*, 2000; Endter *et al.*, 2001; Querido *et al.*, 2001; Roth *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 2001b). Weiterhin wird vermutet, dass die Inaktivierung des E1B-55K-SCS-Motivs zur Veränderung der intranukleären Lokalisation an den PML-NBs führt und die transformierenden Eigenschaften des viralen Proteins deutlich reduziert (Endter *et al.*, 2001). Weitere Befunde zeigten, dass die nukleäre Anreicherung von E1B-55K durch Veränderung des Kernexportsignals im E1B-Leserahmen zu einer erhöhten Transformationsrate in primären BRK-Zellen führt (Endter *et al.*, 2005). Aufgrund dieser und weiterer Beobachtungen wird angenommen, dass zelluläre PML-NB-Kernstrukturen (Endter *et al.*, 2001) oder assoziierte Faktoren einen Einfluss auf die E1B-55K-abhängige Repression von p53 oder anderer E1B-vermittelter Funktionen haben. Neueste Arbeiten postulieren einen p53-unabhängigen, E1A/E1B-55K-abhängigen Ad5-vermittelten Transformationsweg, welcher in engem Zusammenhang mit der Interaktion von E1B-55K mit Mre11 stehen könnte. Es liegt also nahe, dass für das transformierende Potenzial von E1B-55K nicht nur die Modulation von p53 und Mre11, sondern auch weiterer PML-NB-assoziiierter Proteine wie Daxx (Zhao *et al.*, 2003) eine essenzielle Rolle spielen könnte.

Diese Tatsache wird durch frühere Arbeiten unterstützt, in denen Daxx in einem Hefe-Zwei-Hybrid System als zellulärer Interaktionspartner von Ad2 E1B-55K (Zhao *et al.*, 2003) identifiziert wurde. Weitere Hinweise auf eine Beteiligung von Daxx an der Ad5-vermittelten Onkogenese geben frühere Arbeiten die eine p53-unabhängige Transformation durch E1B-156R in Kooperation mit E1A postulieren. Als zellulärer Interaktionspartner dieser E1B-Isoform konnte bisher nur der Faktor Daxx nachgewiesen werden (Sieber *et al.*, 2007). Weiterhin ist bereits bekannt, dass p53 durch die Anwesenheit von Daxx negativ reguliert wird. Durch Interaktion mit Daxx, wird Mdm2 (*murine double minute protein 2*), ein zellulärer Inhibitor p53-aktivierter Transkription, stabilisiert. Das Onkogen Mdm2 verstärkt die Ubiquitylierung des Tumorsuppressors und leitet so den proteasomalen Abbau von p53 ein (Ronai, 2006). Im Ganzen unterstützt dies die Vermutung einer essenziellen Rolle von Daxx in der E1A/E1B-55K-abhängigen Onkogenese.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit die Interaktion von Ad5 E1B-55K mit Daxx im Detail untersucht, E1B-55K/Daxx-Bindemutanten generiert und deren Einfluss auf onkogene Eigenschaften von E1B-55K überprüft.

5.1.1 Daxx interagiert mit E1B-55K in Ad5-infizierten Zellen

Nachdem Zhao und Mitarbeiter in einem Hefe-Zwei-Hybrid Experiment, Daxx als zellulären Interaktionspartner von Ad2 E1B-55K identifizierten (Zhao *et al.*, 2003), stellte sich die Frage, ob diese Bindung für Ad5 E1B-55K in Säugerzellen bestätigt werden kann. Dazu wurden H1299-Zellen mit Wildtypvirus H5pg4100 und verschiedenen Virusmutanten infiziert. Durch Einführen von Mutationen in den E1B- oder E4orf6-Leserahmen konnten die verwendeten Virusmutanten entweder E1B-55K (H5pm4149) oder E4orf6 (H5pm4154) nicht exprimieren. Zur Untersuchung der E1B-55K/Daxx-Interaktion wurden Koimmunpräzipitations- und *Western Blot* Analysen aus Gesamtzellextrakten durchgeführt (Abb. 7).

Wie erwartet, bestätigen die Ergebnisse die Interaktion zwischen dem viralen Ad5-Protein und zellulärem Daxx (Abb. 7; Spuren 2 und 4). Dabei fällt auf, dass die Abwesenheit von E4orf6 keinen Einfluss auf die Aggregation von E1B-55K und Daxx zu haben scheint (Abb. 7; Spur 4). Allerdings konnte man beobachten, dass die Daxx-Gleichgewichtsmengen in den unterschiedlichen Infektionsansätzen variierten. Im Ganzen zeigt sich eine Reduktion der Daxx-Konzentration bei Anwesenheit von E1B-55K (Abb. 7; Spuren 2 und 4).

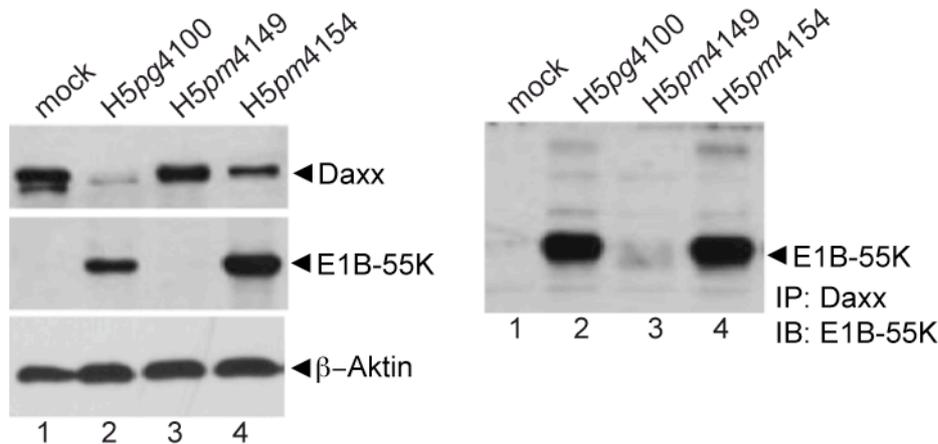


Abb. 7 Interaktion von Daxx mit E1B-55K in infizierten H1299-Zellen

H1299-Zellen wurden mit H5pg4100, H5pm4149 sowie H5pm4154 infiziert (moi 50; 4.3.4), 20 h p.i. geerntet (4.2.5) und lysiert (4.5.2). Zur Überprüfung der Expression wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (100 μ g für Daxx, 50 μ g für E1B-55K und β -Aktin) mittels 12%iger (E1B, β -Aktin) oder 10%iger (Daxx) SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen Daxx, E1B (2A6) oder β -Aktin (AC-15) als Ladekontrolle inkubiert (4.6.4). Zur Koimmunpräzipitation der verschiedenen E1B-Proteine mit Daxx wurde 1 mg Zellysate zuvor mit dem Daxx-Antikörper immunpräzipitiert (4.6.5), über 12%ige SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen E1B (2A6) inkubiert.

Im nächsten Schritt dieser Arbeit sollte der interagierende Sequenzabschnitt im E1B-55K-Leserahmen identifiziert werden.

5.1.2 Identifikation eines Daxx-Bindemotivs und Herstellung von E1B-55K Mutationen in diesem Bereich

Durch Literatursuche in der MEDLINE-Datenbank (National Library of Medicine) ließen sich zwei unterschiedliche Konsensusmotive für Daxx-Interaktionsbereiche verschiedener Proteine identifizieren (Lalioti *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2000a; Li *et al.*, 2000b). Zunächst wurde E1B-55K auf diese AS-Sequenzen hin untersucht. Die Auswertung

dieser Analyse ergab zwei unabhängige Bereiche (AS 183-213 und AS 446-474), die für die Interaktion mit Daxx essenziell sein könnten.

Um dies zu überprüfen, wurden E1B-Plasmide mit Punktmutationen in den kodierenden Sequenzen potentieller Interaktionsbereiche generiert (Abb. 8). Die Herstellung dieser Mutanten erfolgte mit Hilfe des *Quik Change™ Site-Directed Mutagenesis Kits* (Stratagene). Als DNA-Matrize diente pcDNA3-E1B-55K (E1B-wt). Die Lage der Punktmutationen im E1B-Genabschnitt sowie die veränderten Basenpaare sind in Abbildung 8 angegeben.

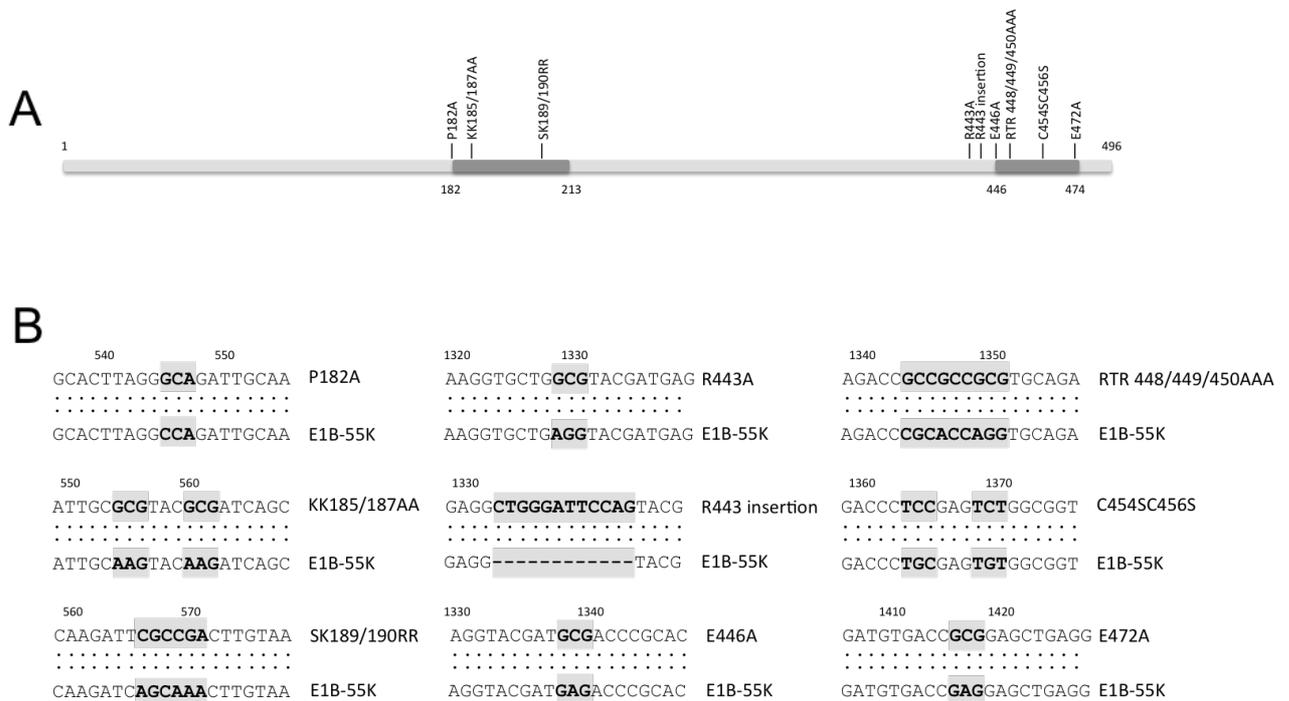


Abb. 8 Übersicht der untersuchten E1B-55K Mutanten im E1B-Leserahmen

A. Die vermuteten Konsensussequenzen der Daxx-Bindemotive sind entsprechend ihrer Lage im E1B-55K-Protein dargestellt (dunkelgrau). Die jeweils eingeführten Mutationen sind entsprechend der Lage im E1B-55K Leserahmen angegeben. B. Die Basenaustausche in den Motiven verglichen zur Wildtypsequenz sind jeweils mit grauen Balken hinterlegt. Nummern kennzeichnen die Position der Nukleotide im E1B-Gen.

Als erstes wurde die Expression der verschiedenen Plasmide nach Transfektion in H1299-Zellen untersucht (Abb. 9A). Dazu wurden 20 h p.t. Gesamtzellextrakte hergestellt und über SDS-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. In allen Lysaten konnten ausreichende E1B-55K-Proteinmengen nachgewiesen werden

(Abb. 9A). Mittels Immunpräzipitation konnte anschließend gezeigt werden, dass die E1B-Punktmutanten KK185/187AA sowie E472A die Fähigkeit zur Interaktion mit Daxx verloren haben (Abb. 9B, Spuren 4 und 8).

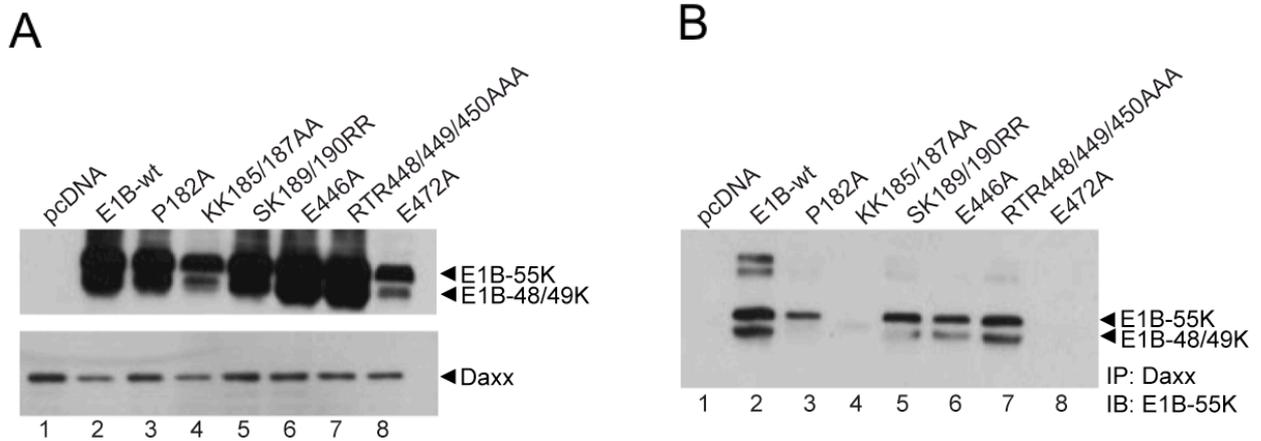


Abb. 9 Interaktion von Daxx mit E1B-55K in transfizierten H1299-Zellen

H1299-Zellen wurden mit E1B-55K und den E1B-Mutanten nach der PEI-Methode transfiziert (4.2.4.1), 20 h p.t. geerntet (4.2.5) und lysiert (4.5.2). A. Zur Überprüfung der Expression wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (100 µg für Daxx, 50 µg für E1B-55K) mittels 12%iger (E1B-55K) oder 10%iger (Daxx) SDS-Gele aufgetrennt (4.6.3), durch *Western Blot* auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen Daxx und E1B (4E8) inkubiert (4.6.4). B. Zur Koimmunpräzipitation der verschiedenen E1B-55K-Proteine mit Daxx wurde 1 mg Zellysate mit dem Daxx-Antikörper immunpräzipitiert (4.6.5) und dann über 12%ige SDS-Gele aufgetrennt (4.6.3). Anschließend wurden die Proteine mittels *Western Blot* auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen E1B (4E8) inkubiert.

Im Ganzen weisen diese Beobachtungen darauf hin, dass E1B-55K zwei unabhängige Daxx-Interaktionsmotive in den Bereichen AS 185/187 und AS 472 besitzt. Weiterhin lassen die Ergebnisse vermuten, dass auch SUMO-modifiziertes E1B-55K mit zellulärem Daxx interagiert, da diese E1B-Formen ebenfalls mit dem Daxx spezifischen Antikörper kopräzipitiert werden können (Abb. 9B, Spuren 2, 5 und 7). In Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten detektiert der E1B-spezifische Ratten-Antikörper 4E8 neben E1B-55K auch zwei N-terminal verkürzte Isoformen E1B-48/49K und zeigt deshalb im Immunoblot eine Doppelbande (Kindsmuller et al., 2009). Dies erklärt auch die Doppelbande für SUMOyliertes E1B, welches aufgrund des um 20 kD höheren Molekulargewichts eine verzögerte Laufgeschwindigkeit im elektrophoretischen Spannungsfeld aufweist.

Die Ergebnisse korrelieren mit den Arbeiten von Zhao und Mitarbeitern, die für Ad2 E1B-55K den für die Daxx-Bindung essenziellen Bereich auf die AS 437-495 einschränkten. Allerdings wurde in diesen Arbeiten nicht berücksichtigt, dass es möglicherweise mehrere Interaktionsmotive im E1B-Protein geben könnte. Es wurden Volllänge Ad2 E1B-55K und die Ad2 E1B-55K-Fragmente AS 155-495 sowie AS 437-495 auf Daxx-Interaktion getestet. Alle Konstrukte zeigten ein positives Ergebnis (Zhao *et al.*, 2003). Damit kann eine zusätzliche Bindestelle im N-Terminus nicht ausgeschlossen werden.

Um die Konservierung der identifizierten Daxx-Interaktionsmotive im E1B-55K-Protein zu überprüfen, wurden die Sequenzen der E1B-Genprodukte von insgesamt 18 unterschiedlichen humanen Ad-Serotypen mit Hilfe der *Vector NTI* Software miteinander verglichen (Abb. 10). Interessanterweise zeigte diese Computeranalyse erstmals, dass beide postulierten Bindungsmotive für Daxx (Abb. 10, dunkelgrauer Balken) in den E1B Proteinen aller untersuchten Serotypen hoch konserviert sind.

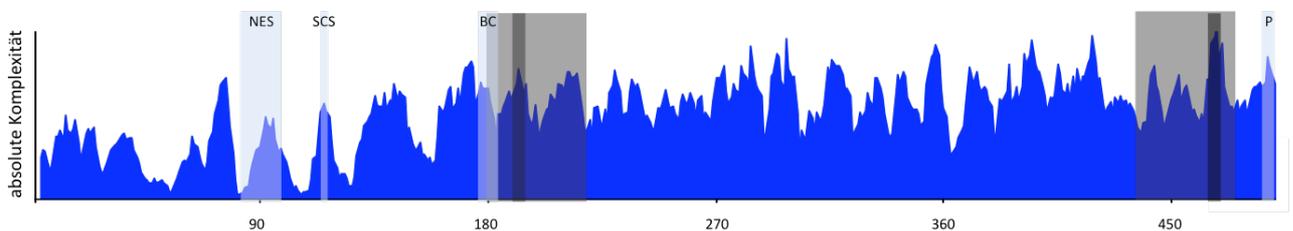


Abb. 10 Übersicht über beide hoch konservierten Daxx-Bindemotive im E1B-55K unterschiedlicher humaner Ad-Serotypen

Interner AS-Sequenzvergleich von 18 Ad-Serotypen aus allen bisher beschriebenen sieben humanen Supgruppen A-G. In x-Richtung sind die AS des E1B-55K-Proteins angegeben. Der y-Wert (blau) ist ein Maß für die AS-Sequenzhomologie unter den Serotypen. Das Diagramm zeigt das absolute Komplexitätsprofil des Ad E1B-55K-Proteins in den untersuchten Serotypen. Beide Daxx-Bindungsmotive sind hellgrau hinterlegt, die tatsächlichen E1B-55K/Daxx-Bindungsmutanten sind dunkelgrau angefärbt. Weitere bekannte Motive (NES, SCS, BC, P) sind hellblau hinterlegt.

Dies ist ein erster Hinweis auf die Bedeutung der E1B-55K/Daxx-Interaktion und lässt wichtige Funktionen von Daxx während der produktiven Ad5 Infektion vermuten. Weitere konservierte Regionen im E1B-Protein sind ausschliesslich wichtige Domänen oder Motive mit multiplen Auswirkungen auf die Funktionen des viralen Proteins. Diese Bereiche im E1B-55K sind das CRM1-abhängige NES/AS 83-93, dass für

nukleozytoplasmisches Pendeln von E1B-55K benötigt wird (Krätzer *et al.*, 2001) sowie das SUMO-Konjugationsmotiv/AS 104 (Endter *et al.*, 2001), eine postulierte BC-Box/AS 179-188 zur Interaktion mit den zellulären Faktoren Elongin B und C (Blanchette *et al.*, 2004), sowie die konservierte Phosphorylierungsdomäne/AS 490/491/495 im C-Terminus (Teodoro *et al.*, 1994).

5.1.2.1 Mutationen im Daxx-Bindemotiv zeigen einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von E1B-55K

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde im nächsten Schritt die subzelluläre Verteilung der E1B-Mutanten untersucht. Bisherige Arbeiten ergaben, dass das E1B-55K in infizierten Zellen ein sehr komplexes Muster sowohl nukleärer als auch zytoplasmatischer Lokalisation zeigt (Grand *et al.*, 1984; Ornelles *et al.*, 1991; Smiley *et al.*, 1990). E1B-55K konnte man in transfizierten Zellen bereits in früheren Untersuchungen in kernnahen Aggregaten, sogenannten *perinuclear bodies* detektieren (Araujo *et al.*, 2005).

Zur Analyse des Einflusses der eingeführten Mutationen auf die E1B-55K Lokalisation wurden zunächst H1299-Zellen mit den hergestellten E1B-Plasmiden transfiziert. Durch Immunfluoreszenzanalysen konnte das virale Protein anschließend nachgewiesen werden (Abb. 11). Wie erwartet, zeigen die Zellen, die mit dem E1B-wt-Konstrukt transfiziert wurden, ein komplexes Lokalisationsmuster. Größtenteils ist das E1B-Protein im Zytoplasma in perinukleären Strukturen, aber auch zu sehr geringen Mengen diffus im Zellkern verteilt (Abb. 11c). Ähnliche Lokalisationen konnte man für das veränderte E1B-55K-Protein der Mutanten SK189/190RR (Abb. 11e) und RTR448/449/450AAA (Abb. 11i) feststellen. E1B-55K konnte fast ausschließlich in einem zytoplasmatischen meist punktförmigem *perinuclear body* an der Peripherie des Zellkerns (ca. 90%) beobachtet werden. Alle anderen E1B-Proteine (Abb. 11 g, k, m, o, q, s, u) lokalisieren diffus in Zytoplasma und Zellkern mit zahlreichen punktförmigen Aggregationen im und in der Nähe des Zellkerns. Dieser Vergleich zeigte, dass bei fehlender E1B-55K/Daxx-Interaktion die intrazelluläre

Lokalisation von E1B-55K nicht nur auf perinukleäre Strukturen begrenzt ist, sondern vermehrt zu punktförmigen Ansammlungen des Proteins im Nukleus führt.

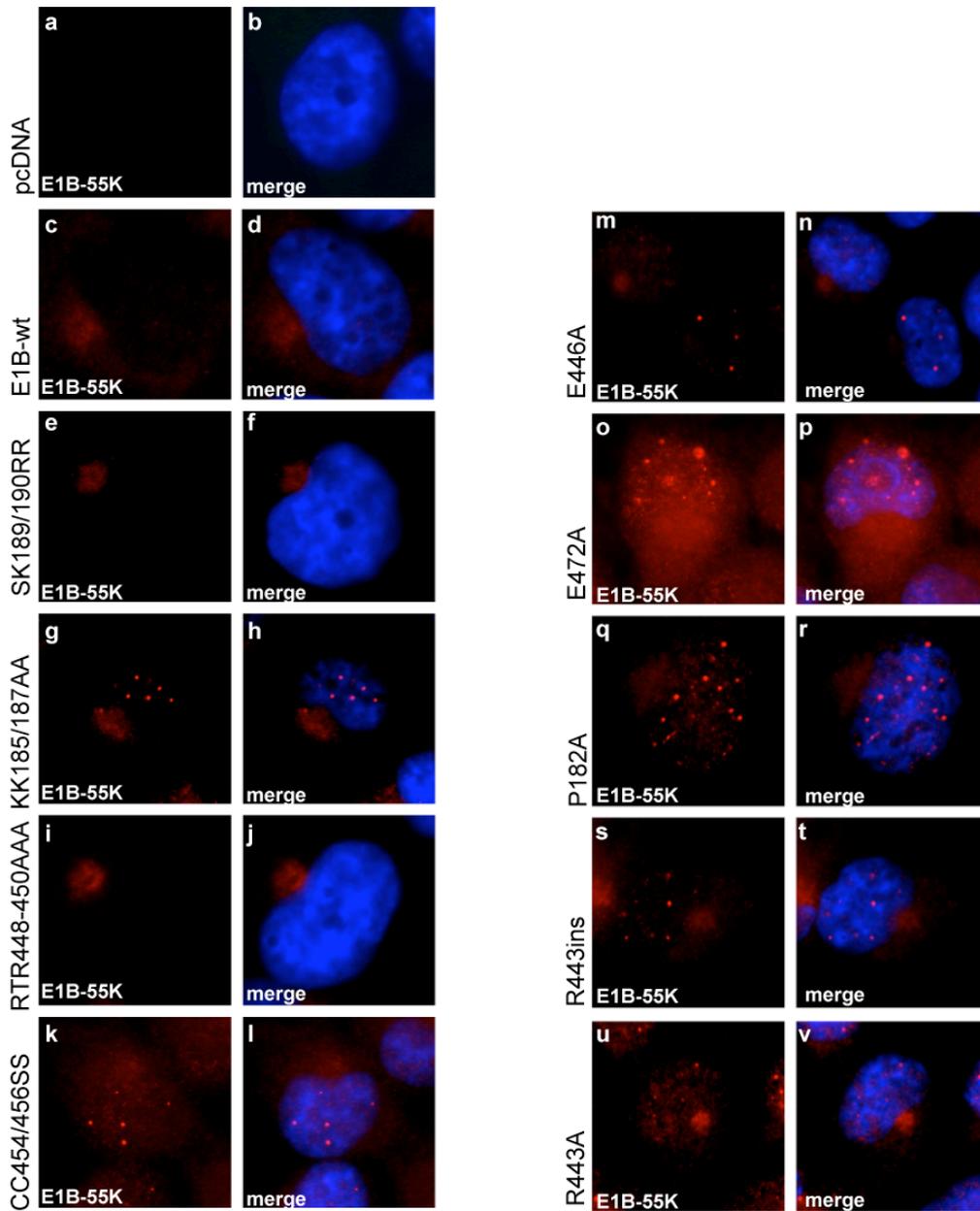


Abb. 11 Intrazelluläre Lokalisation von E1B-55K in transfizierten H1299-Zellen

H1299-Zellen wurden mit den E1B-Konstrukten nach der PEI-Methode transfiziert (4.2.4.1) und 24 h p.t. methanolfixiert (4.6.6.1). Die Immundetektion erfolgte wie unter 4.6.6 beschrieben mit dem α -E1B-Antikörper 4E8 aus Ratte, welcher mit einem α -Ratte-Texasrot-gekoppelten Sekundärantikörper immundetektet wurde. Lage und Größe des Zellkerns wurde mit dapi sichtbar gemacht und in merge mit der E1B-55K Lokalisation überlagert.

5.1.2.2 Mutationen im Daxx-Bindemotiv zeigen keinen Einfluss auf die Interaktion von E1B-55K mit p53 und Mre11

Aufgrund der bereits beschriebenen Ergebnisse war es naheliegend die Interaktionen der E1B-55K/Daxx-Bindemutanten mit p53 und Mre11 zu überprüfen. Dazu wurden erneut Immunpräzipitationsexperimente mit Gesamtzellextrakten aus kotransfizierten H1299-Zellen durchgeführt (Abb. 12).

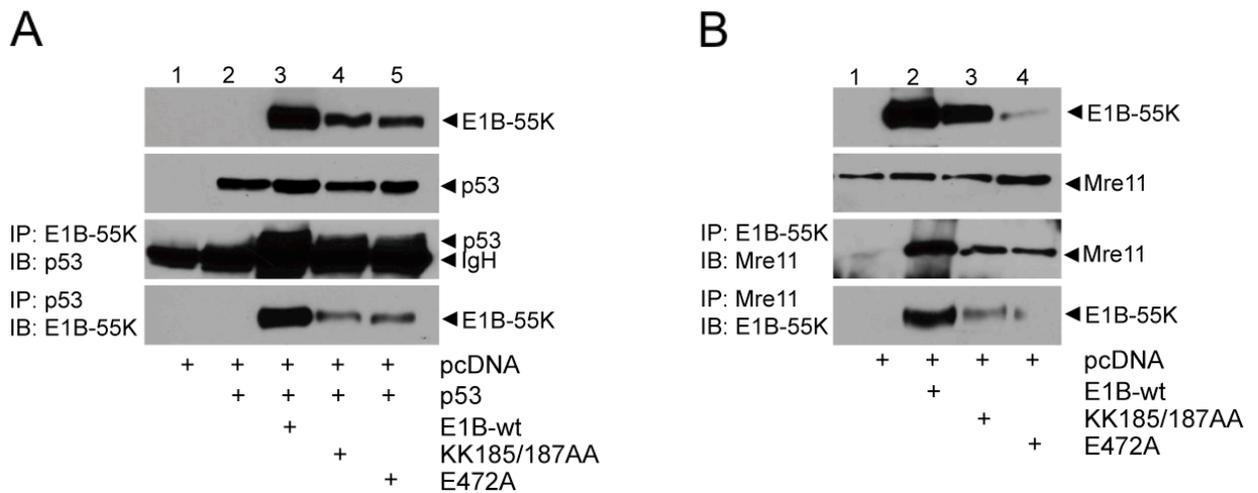


Abb. 12 Interaktion der E1B-55K/Daxx-Bindemutanten mit p53 und Mre11 in transfizierten H1299-Zellen

H1299-Zellen wurden mit E1B-wt, KK185/187AA, E472A und p53 (A) nach der PEI-Methode kotransfiziert (4.2.4.1), 24 h p.t. geerntet (4.2.5) und lysiert (4.5.2). A. Zur Überprüfung der Expression wurden jeweils 50 µg Gesamtzellextrakt für E1B-55K, p53 (A) und Mre11 (B) mittels 12%iger SDS-Gele aufgetrennt (4.6.3), durch *Western Blot* auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen E1B-55K (2A6), p53 (DO-1; A) und Mre11 (B) inkubiert (4.6.4). Zur Koimmunpräzipitation von p53 (A) und Mre11 (B) wurde 1 mg Zellysate mit dem E1B-Antikörper (2A6) immunpräzipitiert (4.6.5), über 12%ige SDS-Gele aufgetrennt (4.6.3) und mit p53 (DO-1; A) und Mre11 (B) Antikörpern immundetektiert. Analog dazu wurde 1 mg Zellysate ebenfalls mit den Antikörpern gegen p53 (DO-1; A) und Mre11 (B) immunpräzipitiert und dem E1B-Antikörper (2A6) immundetektiert.

Um die Interaktion der E1B-Proteine mit dem Tumorsuppressor p53 nachzuweisen, wurde das Zellysate zuerst mit dem α-E1B-Antikörper 2A6 sowie in einem weiteren Ansatz mit dem α-p53-Antikörper DO-1 immunpräzipitiert. Durch *Western Blot* Analysen konnten dann p53 oder E1B-55K detektiert werden (Abb. 12A). Die Auswertung dieses Versuchs zeigte wie erwartet, dass Wildtyp-E1B-55K in den kotransfizierten Zellen mit p53 interagiert (Abb. 12C, Spur 3). Weiterhin kann die p53-

Interaktion für die E1B-Proteine der beiden Mutanten KK185/187AA und E472A bestätigt werden (Abb. 12C, Spuren 4 und 5). Jedoch konnte aufgrund der geringeren Gleichgewichtsmengen von E1B-55K bei den beiden Mutanten, eine im Vergleich zu E1B-wt schwache Interaktion mit dem zellulären Tumorsuppressor nachgewiesen werden. Wie bereits erwähnt wurde neben p53, Mre11 als weiterer Bindungspartner des Ad5 E1B-55K-Proteins identifiziert (Blanchette *et al.*, 2004; Carson *et al.*, 2003). Mre11 ist zentraler Bestandteil des trimeren DNA-Doppelstrangbruch-MRN-Reparaturkomplexes und interessanterweise auch mit PML-NBs assoziiert (Dellaire *et al.*, 2004a; Endter *et al.*, 2005; Härtl *et al.*, 2008). Zur Überprüfung der E1B-55K/Mre11-Bindung wurden weitere Immunpräzipitationsexperimente mit Gesamtzellextrakten aus den transfizierten H1299-Zellen durchgeführt (Abb. 12B). Zur Untersuchung der Interaktion der E1B-55K-Proteine mit dem endogenen Mre11-Protein wurde das Zelllysate mit dem α -E1B-Antikörper 2A6 sowie in einem weiteren Ansatz mit dem α -Mre11-Antikörper immunpräzipitiert. Durch *Western Blot* Analysen konnten Mre11 oder E1B-55K detektiert werden. Es fällt auf, dass die Interaktion des zellulären Faktors mit E1B-55K neben dem Wildtyp-Protein (Abb. 12B, Spur 2) auch für bei Daxx-Bindemutanten (Abb. 12B, Spuren 3 und 4) beobachtet werden konnte. Für die Mutante E472A konnte nur eine sehr schwache Mre11-Bindung detektiert werden. Dies kann aber auf die sehr geringen Gleichgewichtskonzentrationen des E1B-55K-Proteins zurückgeführt werden (Abb. 12B, Spur 4). Im Ganzen weisen diese Befunde darauf hin, dass die E1B-55K/Daxx-Interaktion keinen Einfluss auf die p53- oder Mre11-Bindung des E1B-55K-Proteins hat.

5.1.2.3 Mutationen im Daxx-Bindemotiv haben keinen Einfluss auf die transkriptionsreprimierenden Funktionen von E1B-55K

Bisher ist bekannt, dass E1B-55K transaktivierende Funktionen von p53 hemmt (Teodoro *et al.*, 1997a; Yew *et al.*, 1992b). Grundlage dafür ist die Interaktion zweier zentraler Bereiche von E1B-55K an die N-terminale Domäne des Tumorsuppressors (Kao *et al.*, 1990a; Sarnow *et al.*, 1982b; Shen *et al.*, 2001a; Yew *et al.*, 1990). Da die E1B-55K/Daxx-Bindungsmutanten keinen Nachteil in der Interaktion mit p53 zeigten,

sollten nun funktionellen Defekte bezüglich der Repression von p53 ausgeschlossen werden (Abb. 13).

Dazu wurden p53-negative H1299-Zellen mit dem Plasmid pRE LUC, das die *Firefly*-Luziferase unter der Kontrolle eines artifiziellen, p53-abhängigen Promotors mit fünf p53-Bindungsstellen exprimiert, einem konstitutiv p53-exprimierenden Plasmid pC53-SN3 (p53) und den verschiedenen in Abbildung 13 angegebenen E1B-Expressionsplasmiden sowie der Vektorkontrolle transfiziert. Die Aktivität der *Firefly*-Luziferase wurde nach 48 h luminometrisch bestimmt und die Messwerte mit der internen Kontrolle (*Renilla*-Luziferase) normalisiert (Abb. 13A).

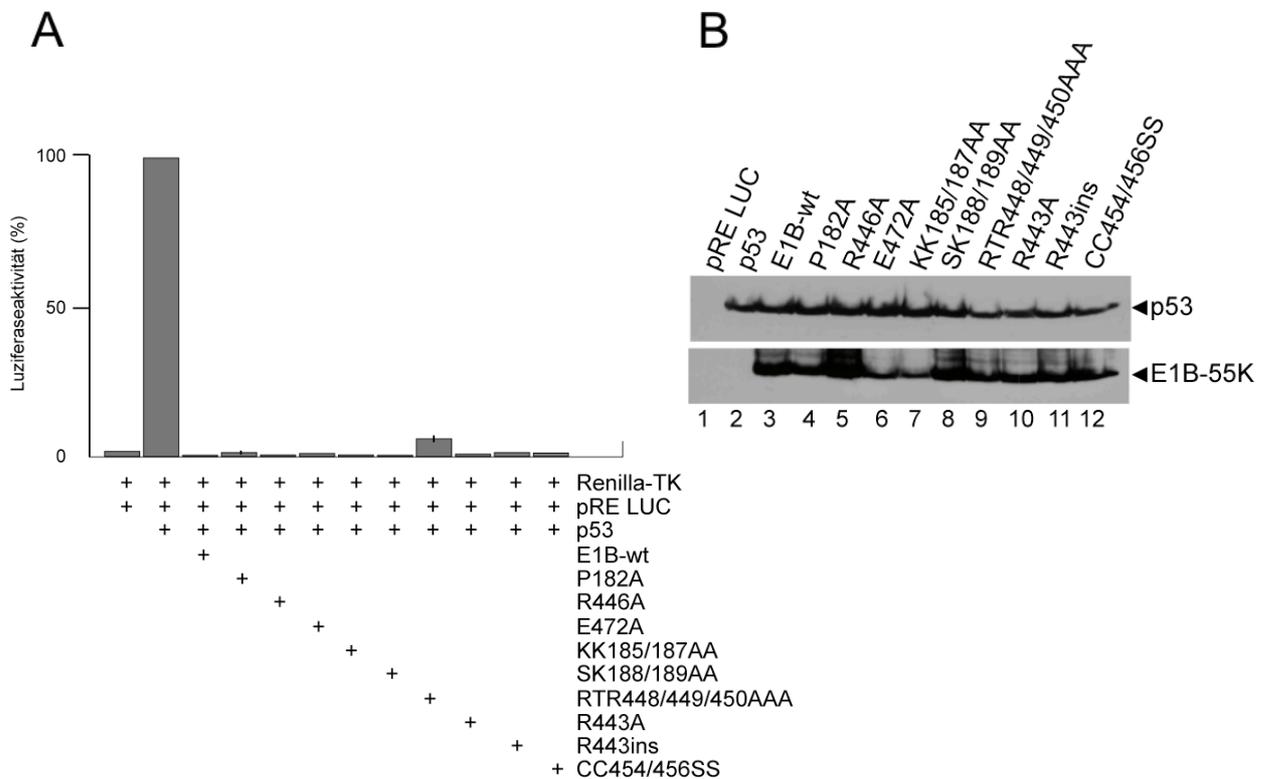


Abb. 13 Effekte von E1B-55K und E1B-55K/Daxx-Bindungsmutaten auf die p53-abhängige Transaktivierung

A. H1299-Zellen wurden mit den Reporter- und/oder Effektorplasmiden (4.6.7) nach der PEI-Methode (4.2.4.1) transfiziert. 48 h p.t. wurden die Zellen mit Lyse-Puffer (Promega) aufgeschlossen und die Aktivität der einzelnen Konstrukte mit dem *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega) bestimmt. Die Aktivität der *Firefly*-Luziferase in Anwesenheit von Wildtyp p53 (pC53-SN3) wurde auf 100% normiert und dient als Positivkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. B. Die Proteinproben aus dem Luziferase-Assay wurden über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch *Western Blot* auf Nitrozellulose übertragen (4.6.4), um die Gleichgewichtsmengen der E1B-Proteine und des Tumorsuppressors p53 mit Hilfe des 2A6 (E1B) oder DO-1 (p53) Maus-Antikörpers zu bestimmen.

Die Auswertung der Versuche zeigte wie erwartet, dass das E1B-55K Wildtypprotein (E1B-wt) die p53-vermittelte Transkriptionsaktivierung fast vollständig inhibiert. Unter den gewählten Bedingungen wurden Restaktivitäten von etwa 3% im Vergleich zum Kontrollansatz ohne pE1B-55K ermittelt. Alle getesteten E1B-55K-Punktmutanten waren mit *Firefly*-Luziferaseaktivitäten unter 9% deutlich in der Lage, die Transkriptionsrate des Reportergens zu inhibieren. Um auszuschließen, dass die beschriebenen Phänotypen der E1B-Mutanten auf Expressionsrate oder Stabilität von E1B-55K oder p53 beruhen, wurden die Gleichgewichtsmengen dieser Proteine mit Gesamtzellextrakten aus den Reportergenversuchen durch *Western Blot* Analysen bestimmt (Abb. 13B). Die Auswertung dieser Versuche ergaben keinen Stabilitätsverlust des E1B-Proteins bei Einführung der beschriebenen Punktmutationen. Zusammenfassend zeigen diese Daten eindeutig, dass die Interaktion zwischen dem viralen Protein und Daxx keinen Einfluss auf die E1B-abhängige Inhibition der p53-stimulierten Transkription hat.

Im nächsten Schritt wurde in weiteren Reportergenversuchen überprüft, ob die AS-Austausche die intrinsische Repressoraktivität des E1B-55K-Proteins beeinflussen. Diese Analyse basiert auf der Beobachtung, dass Ad2/5 oder Ad12 E1B-55K als Fusionsprotein mit der Gal4-DNA-Bindedomäne aus *S. cerevisiae*, die Transkription von Promotoren mit Gal4-DNA-Bindestellen effizient reprimiert (Yew *et al.*, 1994b). Diese Aktivität ist dabei unabhängig von p53 und wird durch den C-terminalen Bereich der viralen Proteine über die Wechselwirkung mit zellulären Korepressoren vermittelt (Martin *et al.*, 1999b). Da Daxx zu Beginn dieser Arbeit bereits eindeutig als Interaktionspartner von E1B-55K beschrieben wurde und Homologien zu bereits beschriebenen Korepressoren aufweist (Hollenbach *et al.*, 2002), wurden nun eventuelle reprimierende Eigenschaften des zellulären Transkriptionsfaktors in Kooperation mit E1B-55K untersucht (Abb. 14).

Zur Durchführung dieser Analysen wurden die cDNAs der Bindemutanten KK185/187AA, E472A und Kontrollplasmide (E1B-wt) zunächst in den Vektor pG4 kloniert, der die Expression von Fremdgenen als Gal4-Fusionsproteine unter der Kontrolle eines viralen Promotors ermöglicht. Anschließend wurden H1299-Zellen,

mit dem Reporterplasmid pGalTK-Luc und den verschiedenen Gal4-E1B-Expressionsplasmiden transfiziert. Das Plasmid pGalTK-LUC enthält fünf DNA-Bindestellen für Gal4 im Kontext des starken Thymidinkinase-Promotors (TK) von Herpes-Simplex Virus Typ-1 (HSV-1). 48 h p.t. wurde die Aktivität der *Firefly*-Luziferase lumino-metrisch bestimmt und die Messwerte gegen die interne *Renilla*-Luziferaseaktivität normalisiert (Abb. 14A).

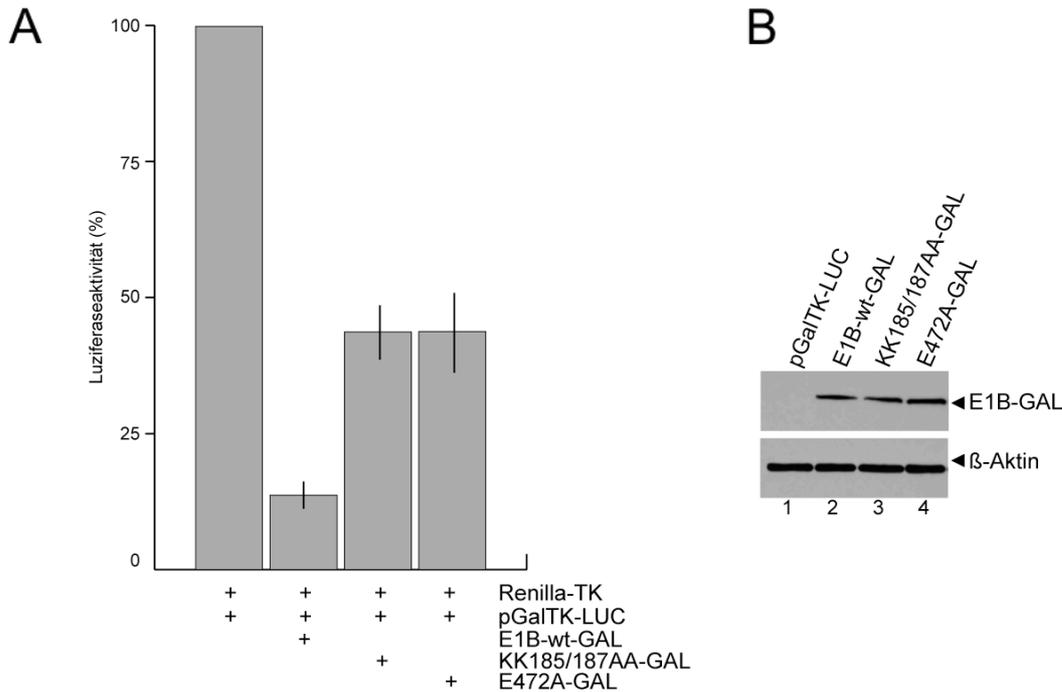


Abb. 14 Repression von pGalTK-Luc abhängig von Gal4-E1B-55K und Gal-E1B-55K/Daxx-Bindemutanten

H1299-Zellen wurden mit pRL-TK (interne Kontrolle), Vektor bzw. pGal4-E1B-Konstrukten (4.6.7) nach der PEI-Methode transfiziert (4.2.4.1). A. 48 h p.t. wurden die Zellen mit Lyse-Puffe (Promega) aufgeschlossen und die *Firefly*-Luziferase-Aktivität mit dem *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega) bestimmt. Die *Firefly*-Luziferase-Aktivität des Reporterplasmids pGalTK-Luc wurde auf 100% normiert und dient als Positivkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. B. Parallel dazu wurden die Proteinproben aus den Transfektionen über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine wurden durch *Western Blot* auf Nitrozellulose übertragen und anschließend die Gleichgewichtsmengen der E1B-Proteine mit Hilfe des α -E1B-Antikörpers 2A6 bestimmt (4.6.4). Der Nachweis des β -Aktin Proteins erfolgte durch den Antikörper AC-15 und diente als Ladekontrolle.

Die Aktivität des GalTK-Promotors wurde durch alle getesteten Gal4-E1B-Fusionsproteine reprimiert, wobei die unterschiedlichen *Firefly*-Luziferase-Aktivitäten in den Transfektionsansätzen zeigten, dass nur durch E1B-wt-GAL mit *Firefly*-

Luziferaseaktivitäten unter 10% deutlich in der Lage sind die Transkriptionsrate des Reportergens zu inhibieren (Abb. 14A). Dagegen konnten bei beiden Daxx-Bindemutanten *Firefly*-Luziferaseaktivitäten bis zu 40% gemessen werden. Folglich haben die AS-Austausche in der Daxx Interaktionsmotiven einen negativen Einfluss auf die intrinsische Repressoraktivität des E1B-55K-Proteins. Parallel dazu wurden Gleichgewichtsmengen der Gal4-E1B-Fusionsproteine durch *Western Blot* Analysen bestimmt (Abb. 14B) und ein vergleichbares Expressionsmuster für E1B-55K nachgewiesen. Im Ganzen zeigen die Ergebnisse, dass die eingeführten AS-Austausche im Daxx-Bindemotiv die Stabilität sowie die p53-abhängigen, reprimierenden Eigenschaften des Ad5 E1B-55K-Proteins auf transkriptioneller Ebene in den überprüften Testsystemen nicht beeinflussen. Dagegen konnte in den p53-unabhängigen Reporter-genversuche 40% Verlust der Repressionsaktivität bei den E1B-55K/Daxx-Bindemutanten nachgewiesen werden.

Im Folgenden soll untersucht werden, ob der Phänotyp der E1B-55K/Daxx-Bindemutanten KK185/187AA und E472A dem klassischen Modell, bei dem das transformierende Potenzial des E1B-55K-Proteins über die Inaktivierung von p53 bzw. p53-regulierter Transkription vermittelt wird, folgt.

5.1.2.4 Mutationen im Daxx-Bindemotiv hemmen die E1A/E1B-55K-abhängige Transformation

Die Rolle der Daxx-Bindemutanten in der E1B-vermittelten Transformation wurde durch klassische Transformationsanalysen überprüft (Abb. 15). Im Vorfeld dieser Untersuchungen wurden die cDNAs der Kontrollplasmide (E1B-wt, E1A) und der Daxx-Bindemutanten KK185/187AA sowie E472A in lentivirale iCer2- und iV2-Vektoren kloniert. Mit Hilfe weiterer Verpackungsplasmide konnten Fremdgen-exprimierende lentivirale Partikel hergestellt werden. Anschließend wurden durch Titration mit Hilfe der Reporterfarbstoffe *Cerulean* (iCer2) und *Venus* (iV2) die genauen Mengen an lentiviralen Partikeln bestimmt. Zur Transformationsanalyse wurden primäre BRK-Zellen mit gleichen Mengen E1A-iV2- und E1B-iCer2-Konstruk-

ten transduziert. In den Kontrollansätzen wurden die Vektoren (iV2/iCer2) sowie E1A (E1A-iV2) zusätzlich einzeln untersucht, um unspezifische *Focus*-Bildung auszuschliessen. Nach zwei bis drei Wochen wurden die transformierten Zellklone/*Foci* mit Kristallviolett angefärbt und ausgezählt (Abb. 15).

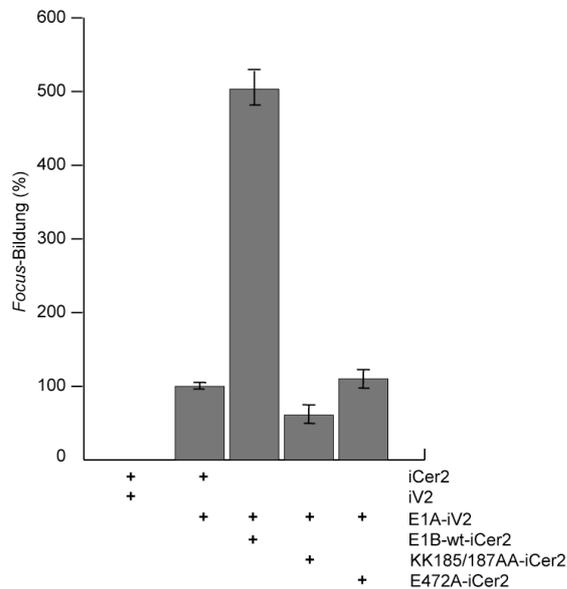


Abb. 15 Focus-Bildung durch E1B-55K und E1B-55K/Daxx-Bindungsmutanten in Kooperation mit E1A

Primäre BRK-Zellen (pBRK) wurden mit den lentiviralen Kontrukten E1A-iV2, E1B-wt-iCer2, KK185/187AA-iCer2 und E472A-iCer2 (100 000 Partikel je Virus auf 3×10^5 Zellen/*6-well*) transduziert und wie unter 4.2.6 beschrieben weiter kultiviert. Die Transformationseffizienz wurde dargestellt als % *Focus*-Bildung relativ zur Aktivität von pE1A, die auf 100% normiert wurde. Das Ergebnis stellt die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen dar.

Interessanterweise führte die Koexpression von E1A mit den jeweiligen Daxx-Bindemutanten reproduzierbar zu einer dramatischen Abnahme der Transformationsrate im Vergleich zum Wildtypprotein. Der größte Unterschied ließ sich für die KK185/187AA E1B-Mutante nachweisen und lag sogar noch unter dem Wert von E1A-iV2 (Abb. 15). Die AS-Austausche im Daxx-Bindemotiv haben somit einen stark negativen Einfluss auf die transformierenden Eigenschaften. Die Ergebnisse der reporterbasierten Untersuchungen und Transformationsanalysen bestätigen, dass der Phänotyp von KK185/187AA und E472A somit nicht dem klassischen E1B-Modell über die Vermittlung des transformierenden Potenzials durch die Hemmung p53-regulierter Transkription entspricht. Dies lässt einen neuen Mechanismus für die Ad5

E1A/E1B-55K-abhängige Transformation vermuten, bei dem die Interaktion von Daxx und E1B-55K eine wichtige Rolle spielt.

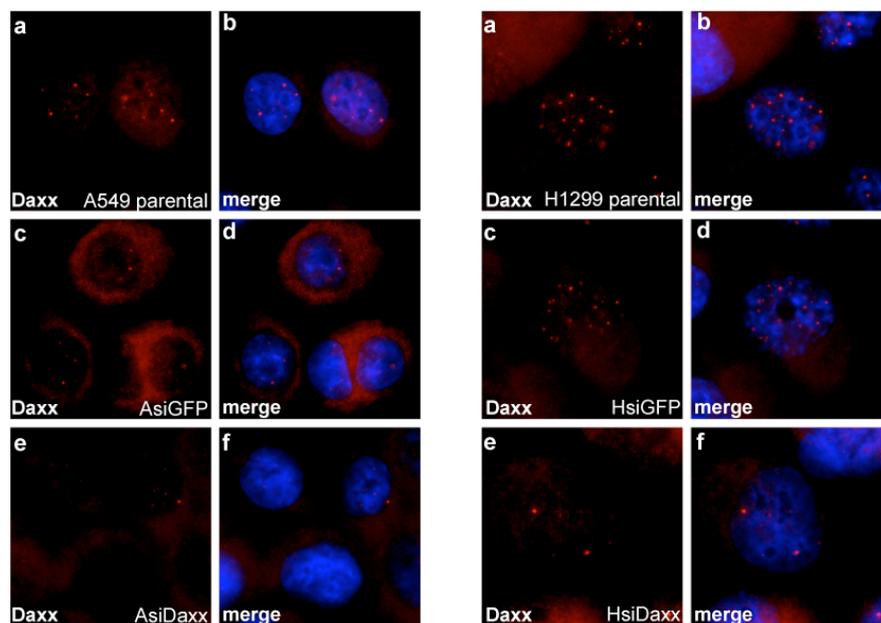
Da die bisherigen Analysen eine wichtige Funktion der Bindung von Daxx an E1B-55K in der Ad5 Onkogenese vermuten lassen, stellt sich im Folgenden die Frage nach der Rolle von Daxx während der lytischen produktiven Infektion.

5.2 Analysen zur Rolle von Daxx im produktiven adenoviralen Replikationszyklus

5.2.1 Herstellung, Etablierung und Charakterisierung von Daxx-negativen, transformierten, humanen Zelllinien

Ein Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Modellsystems zur Untersuchung von Daxx während der produktiven adenoviralen Infektion. Dazu wurden im Vorfeld die humanen Tumorzelllinien A549 und H1299 mit einer shRNA gegen Daxx stabil transfiziert, um die endogene Expression dieses PML-NB-assoziierten Faktors zu minimieren (AsiDaxx/HsiDaxx). Im Folgenden wurde zuerst überprüft, ob die Daxx-Expression, verglichen mit den parental A549- oder H1299-Zellen und einer zusätzlichen Kontrollzelllinie in der jeweiligen Zelllinie reduziert ist.

A



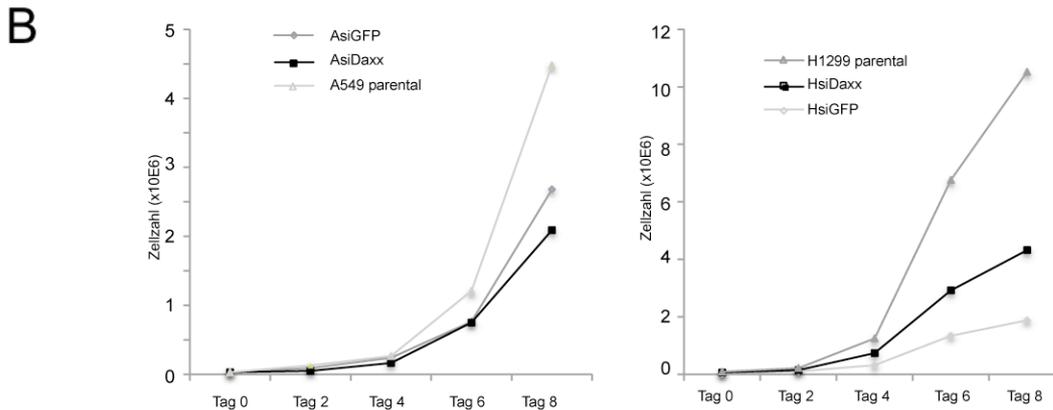


Abb. 16 Daxx-Reduktion und Wachstumsverhalten der H1299- und A549-Zelllinien

A. Immunfluoreszenzanalyse zur shRNA induzierten Depletion des zellulären Daxx Proteins. A549-, AsiGFP-, AsiDaxx-, H1299-, HsiGFP- und HsiDaxx-Zellen, wurden nach der Methanol Fixierung (4.6.6.1) mit dem α -Kaninchen Daxx Antikörper behandelt. Dieser wurde wiederum mit einem α -Kaninchen-Texasrot-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Die Lage und Größe des Zellkerns wurde mit dapi sichtbar gemacht. B. Pro Zelllinie wurden jeweils 3×10^4 Zellen in einer 6-well Schale (Sarstedt) ausgesät und zwei, vier, sechs und acht Tage nach Aussaat die Anzahl der lebenden Zellen mittels Neubauer-Zählkammer (4.2.1) bestimmt. Die Zählungen wurden jeweils als Doppelwerte durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen.

Die Immunfluoreszenzanalysen zeigten eine Reduktion der Daxx-Expression von mindestens 50% in AsiDaxx-Zellen (Abb. 16Ae und Af) und etwa 40% in HsiDaxx-Zellen (Abb. 16Ae und Af) verglichen zur jeweiligen Ausgangs- (Abb. 16Aa und Ab) und Kontrollzelllinie (Abb. 16Ac und Ad).

Um einen eventuellen Proliferationsvorteil einer der generierten Zelllinien auszuschließen, wurde die genaue Zellzahl nach unterschiedlichen Zeitabständen ermittelt und untereinander verglichen. Es konnte festgestellt werden, dass bis Tag 4 keine signifikanten Unterschiede im Zellwachstum abhängig von der Daxx-Expression beobachtet werden konnten (Abb. 16B).

5.2.2 Daxx ist ein negativer Regulator der adenoviralen Replikation in transformierten, humanen Zellen

Im nächsten Schritt wurde die Syntheserate der adenoviralen Nachkommen ermittelt. Dazu wurden die generierten A549- und H1299-Zellen mit Wildtypvirus H5pg4100 infiziert und die Nachkommenproduktion durch Titrationsanalyse ermittelt.

ERGEBNISSE

Konsistent zeigen die Ergebnisse in beiden Tumorzelllinien eine erhöhte Virusnachkommensynthese bei Reduktion des Daxx-Proteinlevels (Abb. 17A, AsiDaxx, HsiDaxx). 72 h p.i. konnte in den AsiDaxx-Zellen eine sechsfach erhöhte Virusausbeute festgestellt werden (Abb. 17A). Dieser enorme Unterschied war bei den H1299-Zellen nicht nachzuweisen. In den Daxx-depletierten HsiDaxx Zellen konnte eine zweifach höhere Syntheserate neuer Viruspartikel gezeigt werden, als in den parental H1299-Zellen. Vermutlich korreliert dieser Unterschied in der Nachkommenvirusproduktion (Abb. 17A) direkt mit der Effizienz der Daxx Depletion (Abb. 17A). Diese Untersuchung zeigt, dass der zelluläre Faktor Daxx in den transformierten humanen Tumorzelllinien A549 und H1299 die adenovirale Replikation negativ beeinflusst.

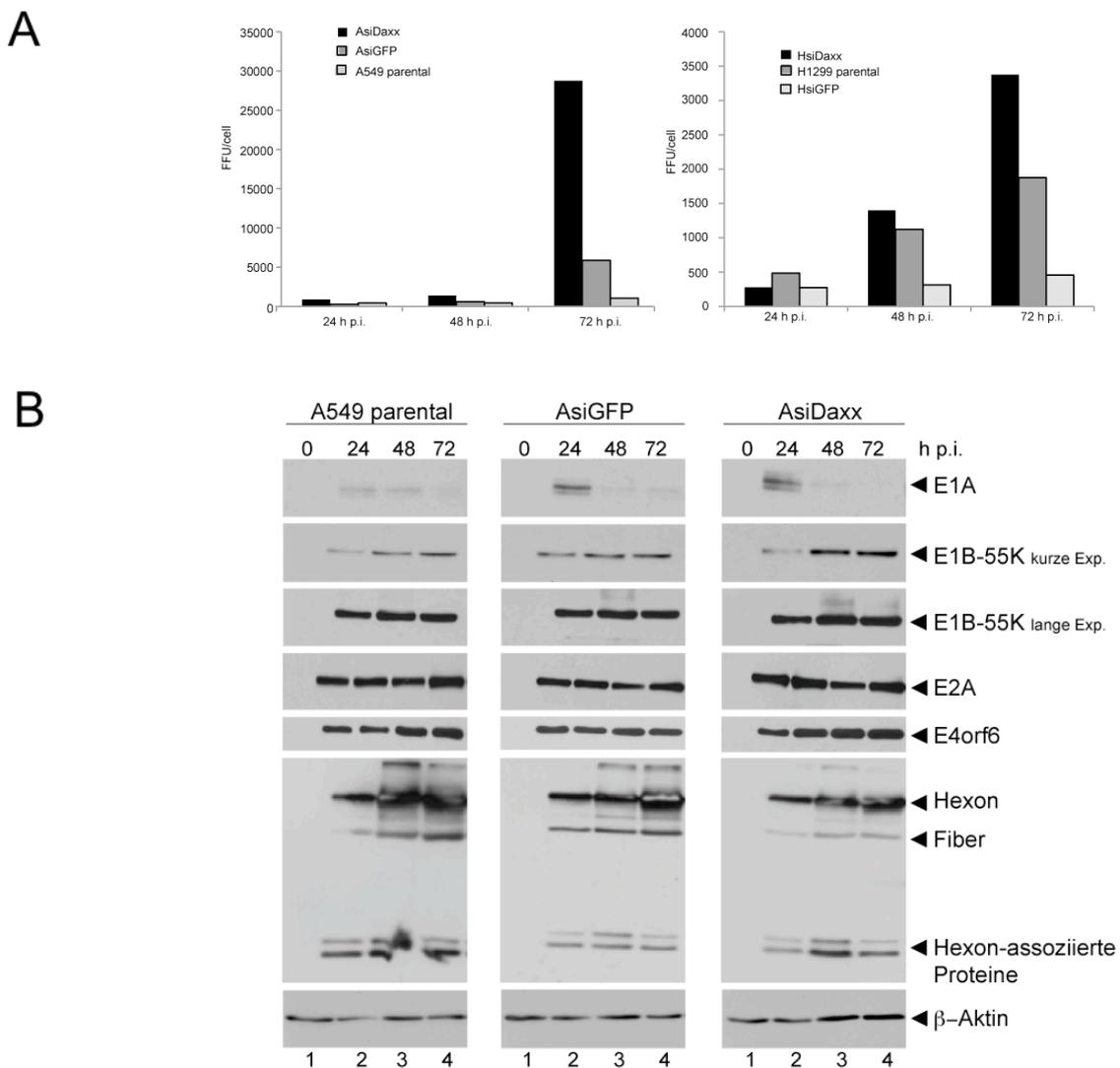


Abb. 17 Nachkommenproduktion und virale Proteinsynthese in infizierten Daxx-depletierten A549- und H1299-Zellen

A. Zur Bestimmung der Ausbeute an Nachkommenviren wurden parentale A549-, AsiGFP-, AsiDaxx-, parentale H1299-, HsiGFP- und HsiDaxx-Zellen mit dem Ad5-Wildtypvirus H5pg4100 (moi 20) infiziert. Die Zellen wurden 24, 48 und 72 h p.i. geerntet und die Nachkommenviren isoliert (4.3.5). Anschließend erfolgte eine Titration auf 293-Zellen (4.3.3). B. A549 parentale, AsiGFP-, AsiDaxx-Zellen wurden mit dem Ad5-Wildtypvirus H5pg4100 (moi 20) infiziert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet. Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht-infiziert (mock). Zur Überprüfung der Expression wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (5 µg bei E2A, Hexon, Penton und Fiber; 30 µg bei E1B-55K, E1A, E4orf6) auf 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert (4.6.4). Der Nachweis erfolgte mit den spezifischen Antikörpern.

Weiterhin wurden die Expressionsmuster in den Wildtyp-infizierten A549-Zelllinien überprüft (Abb. 17B). Es konnte eine verstärkte Expression des E1B-55K-Proteins in infizierten AsiDaxx-Zellen beobachtet werden (Abb. 17B). Hinsichtlich der E1A-, E2A, E4orf6-, Hexon-, Fiber- und Penton-Proteinmengen konnte jedoch abhängig von der Daxx Anwesenheit kein Unterschied festgestellt werden. Dieser Befund der verstärkten E1B-55K-Expression könnte vermutlich mit der Nachkommenvirusproduktion in diesen Zellen korrelieren (Abb. 17A). Es ist bereits bekannt, dass unterschiedlichste Defekte in Tumorzellen sehr oft kompensiert werden können im Vergleich zu primären Zellen (O'Shea *et al.*, 2004). Jedoch kann ein reprimierender Effekt von Daxx auf die E1B-55K-Expression in AsiDaxx-Zellen gut beobachtet werden (Abb. 17B).

5.2.3 Etablierung und Charakterisierung einer Daxx-negativen primären, humanen Zelllinie

Ein Hauptunterschied zwischen normalen Zellen und Tumorzellen ist die Modulation von p53 sowie p53-assoziiierter Faktoren. Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass in nahezu allen Tumorzelllinien p53-abhängige Vorgänge inaktiviert wurden (Bischoff *et al.*, 1996). Im nächsten Schritt stellte sich die Frage, ob der reprimierende Effekt von Daxx hinsichtlich der Ad5-Replikation auf Tumorzellen beschränkt ist. Um diese Analysen durchzuführen wurden im Vorfeld der Untersuchungen eine humane Leberzelllinie HepaRG (Hep parental) generiert (Gripon *et al.*, 2002) bei der mit Hilfe lentiviraler Vektoren, shRNA-Konstrukte gegen humanes Daxx stabil transduziert wurden, um die endogene Expression dieses Faktors zu minimieren (Hep shDaxx). Die in dieser Arbeit charakterisierten HepaRG-Zellen sind ursprünglich aus einem hepatozellulären Karzinom isoliert worden. Allerdings verlor eine Zellpopulation mit

hepatozytenähnlicher Morphologie spontan, nach mehreren Passagen in der Gewebekultur, alle untersuchten Tumormarker, viralen Gene sowie alle viralen Genprodukte und konnte deshalb als nicht-transformiert bezeichnet werden (Gripon *et al.*, 2002; Guillouzo *et al.*, 2007). Wie bisher nur für primäre adulten Hepatocyten bekannt, konnten in den HepaRG-Zellen mehrere Untertypen von Cytochrom P₄₅₀ (CYP 1A2, 2B6, 2C9, 2E1, 3A4), CAR-Rezeptoren (*constitutive androstane receptor*), PXR-Rezeptoren (*pregnane X receptor*) und leberspezifische mRNAs für Albumin, Transferrin und Aldolase B nachgewiesen werden. Interessanterweise besitzen HepaRG-Zellen bei Anwesenheit von DMSO (Dimethylsulfoxid) oder Hydrocortison, vergleichbar mit primären Hepatocyten die Fähigkeit zu adulten Leberzellen ausdifferenzieren und werden deshalb als pseudo-primär bezeichnet (Gripon *et al.*, 2002). Die beschriebene HepaRG Zelllinie wurde in dieser Arbeit als Hep parental bezeichnet.

Im ersten Schritt dieser Arbeit wurde die Infizierbarkeit der humanen Hep-Zellen ermittelt (Abb. 18). Um nun zu überprüfen, wie viele infektiöse Viruspartikel nötig sind, um die Hep-Zellen ausreichend zu infizieren, wurden Testreihen mit unterschiedlichen Virusmengen durchgeführt. Nach 24 und 48 h p.i. konnte dann ermittelt werden, wie viele Zellen bereits infiziert wurden. Die Auswertung dieser Versuche ergab, dass bei einer moi von 50 nach 24 h p.i. 50% der Hep-Zellen bereits infiziert waren (Abb. 18A).

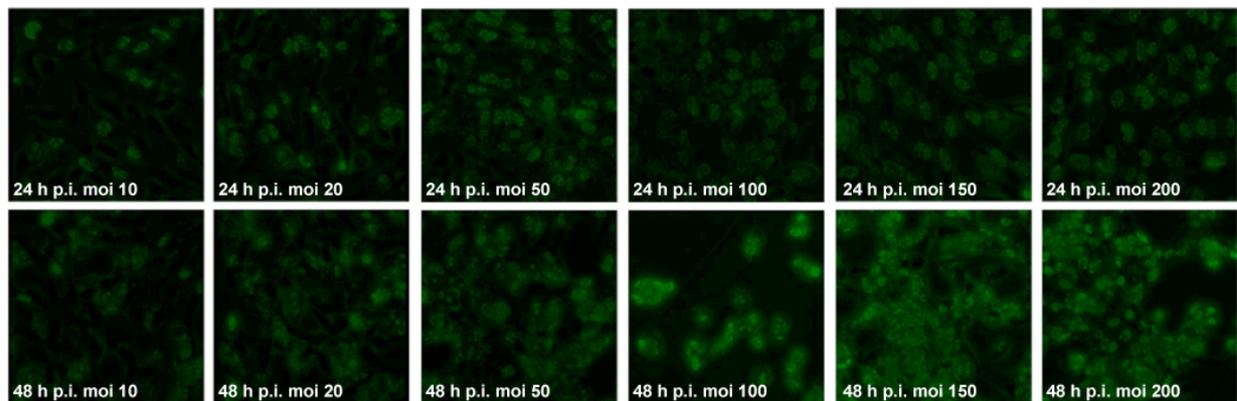


Abb. 18 Infizierbarkeit der Hep-Zelllinien

Hep parental-Zellen wurden mit Ad5-Wildtypvirus H5pg4100 infiziert (4.3.4). Nach 24 und 48 h p.i. wurden die Zellen methanolfixiert. Anschließend wurde das E2A-Proteins (6B-10) immundetektiert und mit einem sekundären α -Maus Alexa-Fluoreszenzantikörper nachgewiesen.

Um weiterhin zu zeigen, dass der produktive Ad5 Lebenszyklus in den nicht-transformierten, humanen Hepatozyten mit bisherigen, bereits publizierten Tumorzelllinien konsistent ist, wurden die parentalen Zellen (Hep parental) mit H5pg4100 Wildtypvirus infiziert (moi 20) und die subzelluläre Lokalisation einiger zellulärer sowie viraler Proteine 24 h p.i. genauer untersucht (Abb. 19). Wie erwartet, zeigen diese Ergebnisse in Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Publikationen, dass E1B-55K diffus in der gesamten Hepatozyte verteilt vorliegt und nukleozytoplasmatische Pendelaktivität besitzt (Gonzalez *et al.*, 2002; Ornelles *et al.*, 1991). Innerhalb des Zytoplasmas lokalisiert E1B-55K in den charakteristischen perinukleären Aggregaten (Abb. 19 Ab, Ae, Ah; Endter *et al.*, 2005). Wie bereits für zahlreiche andere Zelllinien bekannt, konnte auch in den Hep-Zellen eine Aggregation von E1B-55K in mehreren dichten Proteinkomplexen nachgewiesen werden (Liu *et al.*, 1995; Maheswaran *et al.*, 1998; Zantema *et al.*, 1985a). Desweiteren wurde E1B-55K in mehreren globulären Strukturen meist im Bereich ringförmiger E2A-positiver Zusammenlagerungen immundetektiert (Abb. 19 Ab, Ac). Frühere Arbeiten zeigten bereits, dass das virale E4orf3 Protein in infizierten Zellen mit den PML-NBs kolo­kalisiert und daraufhin deren Umverteilung induziert (Carvalho *et al.*, 1995a; Doucas *et al.*, 1996b). Um dies zu überprüfen, wurde in einem weiteren Ansatz die subzelluläre Lokalisation von PML in den Hep-Zellen untersucht (Abb. 19 Ag, Aj). Diese Analysen ergaben, dass die charakteristische punktförmige Aggregation des zellulären PML im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen nicht mehr gleichmäßig über den gesamten Zellkern verteilt war, sondern zusammen mit E1B-55K und E4orf3 in wenigen länglichen nukleären Aggregaten lokalisierte (Abb. 19 Al). E4orf6 zeigt eine ähnlich diffuse Verteilung wie E1B-55K, allerdings nur im Zellkern (Abb. 19 Ad; Goodrum *et al.*, 1996; Ornelles *et al.*, 1991).

Wie bereits frühere Analysen ergaben, ist die Effizienz der Ad5 Infektion in primären Zellen verglichen mit diversen Tumorzelllinien geringer und die Replikation verzögert (Miller *et al.*, 2007). Deswegen wurde zusätzlich die Nachkommenvirensynthese in den Hep-Zellen mit den bereits zahlreich beschriebenen humanen Tumorzell-

zelllinien A549 und H1299 verglichen (Abb. 19B). Bereits frühere Arbeiten zeigen, dass A549 durch Ad5 sehr effizient infiziert werden können (Kindsmüller *et al.*, 2006). Dies wird im Vergleich zu H1299 und den Hepa RG-Zellen sehr deutlich. Bereits 48 h p.i. erreicht die Produktion der Ad5 Nachkommenviruspartikel in Wildtyp-infizierten A549-Zellen die dreifache Menge der Synthesemenge als in infizierten H1299-Zellen (Abb. 19B).

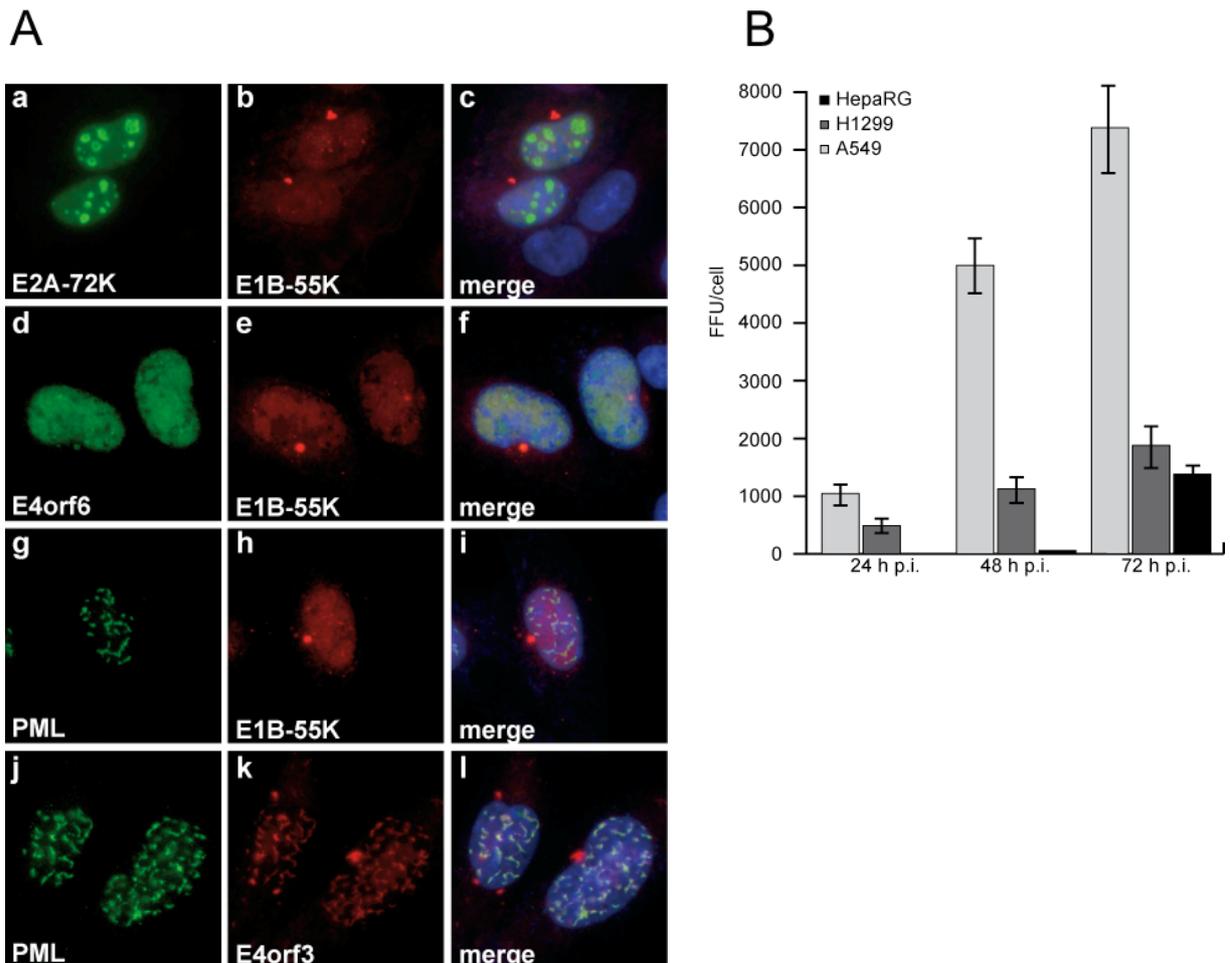


Abb. 19 Lokalisation viraler und zellulärer Proteine sowie Nachkommenvirusproduktion in Wildtyp-infizierten Hep-Zellen

A. Hep parentale Zellen wurden mit H5pg4100 infiziert (moi 20; 4.3.4) und 24 h p.i. fixiert, um die subzelluläre Lokalisation viraler and zellulärer Proteine zu überprüfen. Die Immundetektion erfolgte mit dem α -Maus-E2A(6B-10),-E1B-55K (2A6), -E4orf6 (RSA3), dem α -Ratte-E4orf3 (6A11) und dem α -Kaninchen-PML (H-238) Antikörper. Diese wurden mit α -FITC- (E1B-55K, E4orf3) oder α -Texasrotgekoppelten (E2A, E4orf6, PML) Sekundärantikörpern erkannt. Lage und Größe des Zellkerns wurde mit dapi sichtbar gemacht. Merge zeigt die Überlagerungen der entsprechenden Immunfluoreszenzen.

B. Hep parental-, H1299- und A549-Zellen wurden mit H5pg4100 infiziert (moi 50; 4.3.4). Nach 24, 48 oder 72 h p.i. wurden die Zellen geerntet und die Nachkommensynthese wie unter 4.3.5 beschrieben, ermittelt. Anschließend erfolgte eine Titration auf 293-Zellen (4.3.3).

Die Ergebnisse zeigen eine Verzögerung des Ad5-Replikationszyklus in den pseudo-primären Leberzellen um etwa 24 h im Vergleich zu H1299-Zellen (Abb. 19B). Im Ganzen deuten alle Beobachtungen darauf hin, dass die humane Hep Zelllinie den viralen Replikationszyklus unterstützt und deshalb zur Untersuchung der Funktionen von Daxx im Verlauf der adenoviralen Infektion eingesetzt werden kann.

Im nächsten Schritt wurden in Lentivirus-basierten Transduktionsexperimenten stabile Zellklone isoliert, welche shRNA-Konstrukte gegen humanes Daxx oder PML synthetisieren. Folglich sollten in diesen Zellen Daxx (Hep shDaxx) oder PML (Hep shPML), verglichen zur Ausgangszelllinie (Hep parental), in sehr geringen Mengen synthetisiert werden. Um dies zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt (Abb. 20A). Die Beobachtungen zeigten wie erwartet, dass Hep shDaxx und Hep shPML im Vergleich zur ursprünglichen Zelllinie einen Defekt in der Expression von Daxx (Abb. 20Aa, c linke Seite) oder PML (Abb. 20Aa, c rechte Seite) aufweisen. Zusätzlich wurden Gesamtzellextrakte aus den drei Zelllinien hergestellt. Gleiche Mengen an Gesamtprotein wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels *Western Blot* Verfahren analysiert (Abb. 20B). Konsistent mit den Immunfluoreszenzanalysen (Abb. 20A) zeigten diese Untersuchungen im Vergleich zu Hep parental ebenfalls eine effiziente Depletion von Daxx sowie den PML Isoformen in der entsprechenden Zelllinie (Abb. 20B, Spuren 2 und 6). Interessanterweise konnte auch festgestellt werden, dass die stabile Transduktion der Hepatozyten mit shPML im Vergleich zur parentalen Zelllinie zu einer reduzierten Daxx-Proteinkonzentration führt (Abb. 20B, Spur 3). Eine Reduktion der mRNA-Synthese beider PML-NB-assoziiierter Proteine wurde zusätzlich durch quantitative *Real-time* PCR (qRT-PCR) Analysen mit spezifischen Oligonukleotiden bestätigt (Abb. 20C). Die Auswertung dieser Versuche zeigte, dass die Syntheserate der Daxx mRNA in Hep shDaxx Zellen im Vergleich zur parentalen Kontrollzelllinie (Hep parental) um 70% reduziert ist. Analog dazu konnten in den Hep shPML-Zellen nur noch 20% der ursprünglich für PML kodierenden mRNA nachgewiesen werden. Um die parentale mit der Daxx-depletierten Zelllinie vergleichen zu können, wurde außerdem das Wachstumsverhalten der Zellen durch Ermittlung der Lebendzellzahl über 13 Tage verfolgt (Abb.

20D). Bis zu Tag 5 konnte bei keiner Zelllinie ein signifikanter Wachstumsunterschied beobachtet werden. Anschließend scheint die Daxx-depletierte Zelllinie schneller zu wachsen als die Hep parentalen Zellen (Abb 20D). Da alle in dieser Arbeit durchgeführten Infektionsreihen innerhalb dieses Zeitfensters durchgeführt wurden, kann ein Wachstumsvorteil einer Zelllinie als mögliche Ursache diverser Phänotypen ausgeschlossen werden.

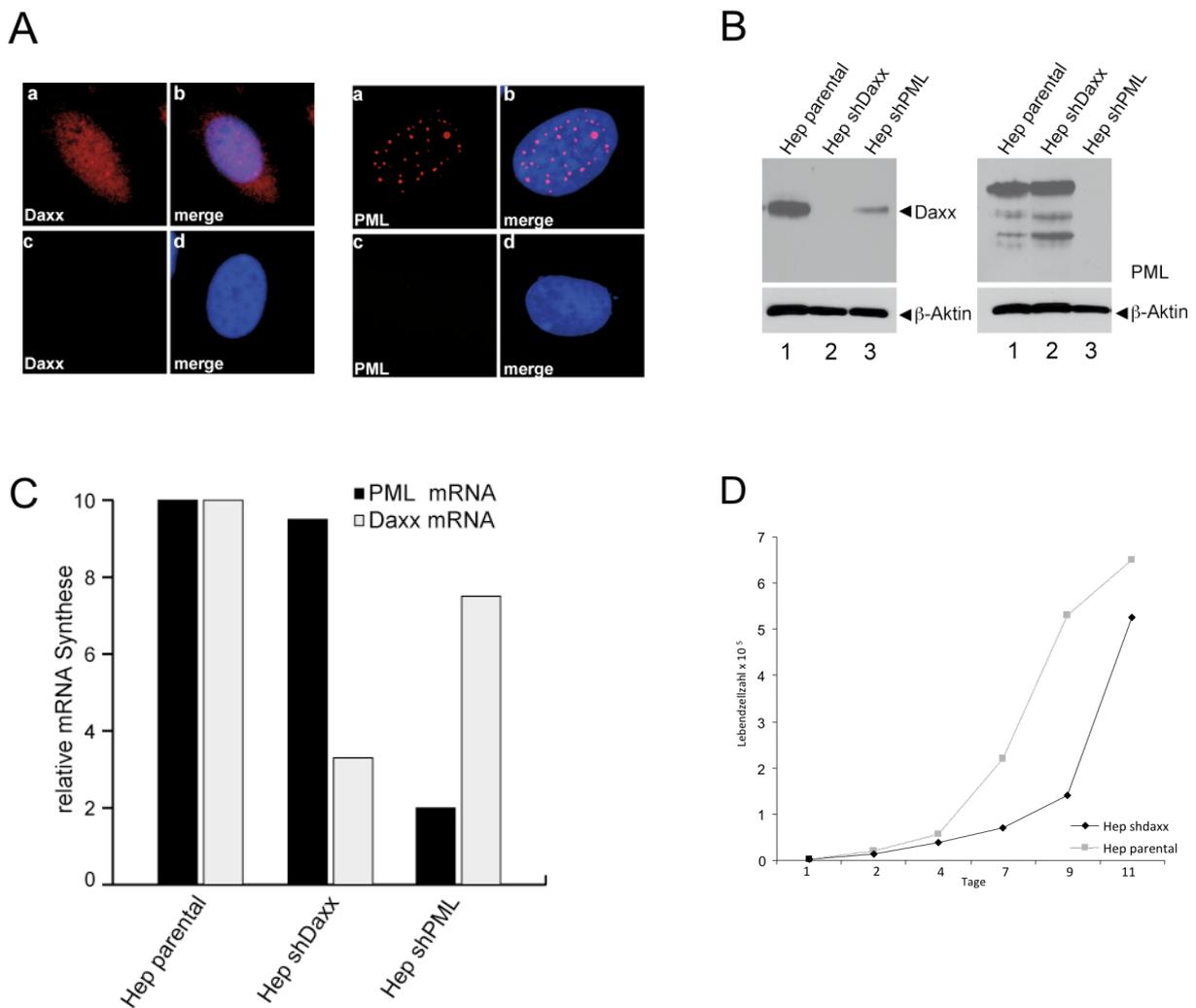


Abb. 20 Herstellung von Daxx- und PML-depletierten Hep-Zelllinien

A. Immunfluoreszenzanalyse zur Depletion des zellulären Daxx- und PML-Proteins. Hep parental- und Hep shDaxx-Zellen, wurden nach der Methanol Fixierung (4.6.6.1) mit dem α -Daxx-Antikörper immundetektiert. Dieser wurde wiederum mit einem α -Kaninchen-Texasrot-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert. Die Lage und Größe des Zellkerns wurde mit dapi sichtbar gemacht. Immunfluoreszenzanalysen zur Depletion des zellulären PML Proteins erfolgten mit dem α -PML-Antikörper und einem α -Kaninchen-Texasrot-gekoppelten Sekundärantikörpern. B. Die Reduktion der Daxx- und PML-Gleichgewichtsmengen wurde mit *Western Blot* Analysen wie in 4.6.4 beschrieben, untersucht. Dazu wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und die Proteine über SDS-Gelelektrophorese

aufgetrennt (4.6.3). Daxx und PML wurden mit den entsprechenden Antikörpern immundetektiert. β -Aktin dient als Ladekontrolle. C. Der induzierte stabile *knock-down* beider Proteine wurde mit qRT-PCR (4.5.4.), als Maß für die jeweilige relative mRNA Synthese überprüft und mit der parentalen Zelllinie verglichen. D. Pro Zelllinie (Hep parental und Hep shDaxx) wurden jeweils 3×10^4 Zellen in die Vertiefungen einer 6-well Schale (Sarstedt) ausgesät und ein, zwei, vier, sieben, neun und elf Tage nach Aussaat die Anzahl der lebenden Zellen mittels Neubauer-Zählkammer (4.2.1) bestimmt. Die Zählungen wurden jeweils als Doppelwerte durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen.

5.2.4 Daxx ist ein negativer Regulator der adenoviralen Replikation in primären, humanen Hepatozyten

Virusmutanten, bei denen die Funktionen von E1B-55K verändert sind, zeigen schwere Defekte bei der Produktion von Nachkommenviren und später viraler Strukturproteine, da u.a. späte virale mRNAs nicht mehr effizient vom Kern ins Zytoplasma transportiert werden können (Babich *et al.*, 1983; Babiss *et al.*, 1985; Pilder *et al.*, 1986a; Pilder *et al.*, 1986b). Zur Untersuchung des Einflusses von Daxx auf die Effizienz der Synthese viraler Nachkommen in primären Zellen, wurden die drei Zelllinien Hep parental, Hep shPML sowie Hep shDaxx mit Ad5-Wildtypvirus H5pg4100 infiziert und die Ausbeute an Nachkommenviren bestimmt (Abb. 21A). Wie erwartet konnten 24 h p.i. in allen untersuchten Zelllinien bereits infektiöse Partikel nachgewiesen werden (Abb. 21A). Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten 48 h p.i. einen 1,5-fachen Anstieg der Viruspartikelsynthese in PML-depletierten Zellen. Überraschenderweise konnte in Daxx-negativen Zellen eine signifikante 4-fache Erhöhung der Rate neusynthetisierter Partikel beobachtet werden (Abb. 21A). Dieser Befund lässt vermuten, dass Daxx ein zelleigener Repressor der adenoviralen Virusproduktion ist. Weiterhin kann aus den Daten geschlossen werden, dass jedoch der Defekt des E1B-negativen Virus H5pm4149 in keiner der Zelllinien kompensiert werden kann (Abb. 21A).

Vor dem Hintergrund dieser hoch-interessanten Beobachtung stellte sich die Frage nach dem viralen Mechanismus den Daxx beeinflusst um die Nachkommenproduktion negativ zu regulieren. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde im Folgenden der Einfluss von Daxx auf Initiation und Effizienz der viralen DNA-Replikation überprüft (Fig. 21B und C). Das Einsetzen sowie der Verlauf der DNA-Synthese wurden durch ein modifiziertes PCR-Verfahren aus virusinfizierten Zellen

bestimmt (Fig. 21B). Dazu wurden die Hep-Zellen mit Wildtypvirus infiziert, nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und aufgeschlossen. Die PCR-Reaktion wurde wie unter 4.4.5.3 beschrieben durchgeführt. Die Reaktionsprodukte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert und mit Hilfe des Computerprogramms *Gene tools* des G-Box Systems (Syngene) densitometrisch quantifiziert (Abb. 21B).

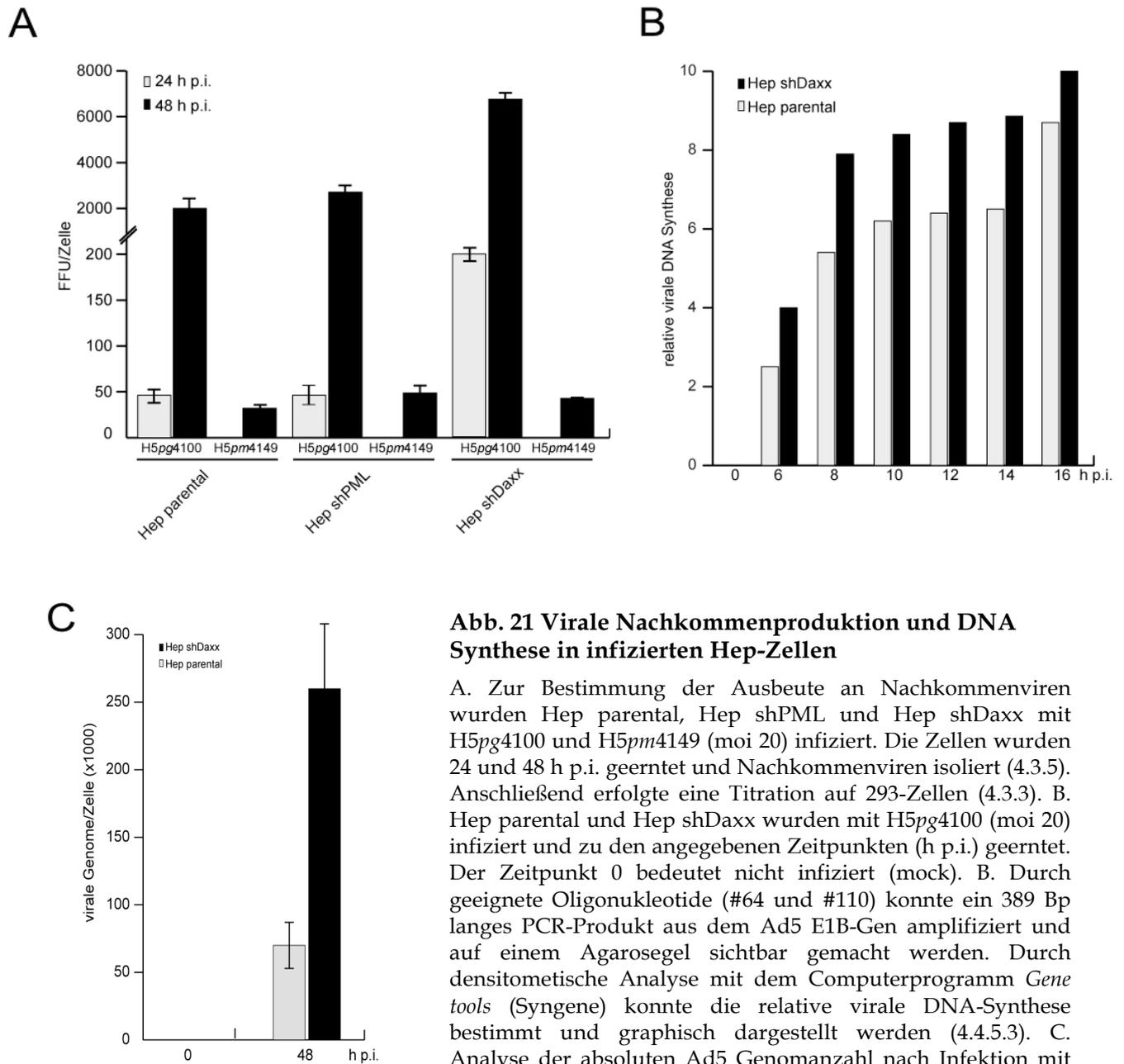


Abb. 21 Virale Nachkommenproduktion und DNA Synthese in infizierten Hep-Zellen

A. Zur Bestimmung der Ausbeute an Nachkommenviren wurden Hep parental, Hep shPML und Hep shDaxx mit H5pg4100 und H5pm4149 (moi 20) infiziert. Die Zellen wurden 24 und 48 h p.i. geerntet und Nachkommenviren isoliert (4.3.5). Anschließend erfolgte eine Titration auf 293-Zellen (4.3.3). B. Hep parental und Hep shDaxx wurden mit H5pg4100 (moi 20) infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet. Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht infiziert (mock). B. Durch geeignete Oligonukleotide (#64 und #110) konnte ein 389 Bp langes PCR-Produkt aus dem Ad5 E1B-Gen amplifiziert und auf einem Agarosegel sichtbar gemacht werden. Durch densitometrische Analyse mit dem Computerprogramm *Gene tools* (Syngene) konnte die relative virale DNA-Synthese bestimmt und graphisch dargestellt werden (4.4.5.3). C. Analyse der absoluten Ad5 Genomanzahl nach Infektion mit H5pg4100 mittels *Real-time* PCR 48 h p.i. (4.5.4).

Die PCR-Analysen ergaben, dass die Initiation der viralen DNA-Synthese innerhalb der ersten 6 h nach Infektion unabhängig von Daxx erfolgt, da zu diesem Zeitpunkt in beiden Zelllinien bereits virale DNA detektiert werden konnte. Der Vergleich zeigte außerdem, dass die Menge der amplifizierten viralen DNA in Zellen mit reduzierten Daxx Konzentrationen im Verlauf des gesamten Untersuchungszeitraumes verglichen zur Kontrollzelllinie höher ist. Deswegen muss ein Einfluss von Daxx auf die Effizienz der viralen DNA-Replikation vermutet werden. Dieser Befund lässt eine Funktion des zellulären Faktors vor allem in der frühen Phase des Infektionszyklus vermuten. Mit diesem semi-quantitativen PCR-Verfahren konnten jedoch keine Aussagen über die absolute Menge viraler DNA getroffen werden. Deswegen wurde die genaue Anzahl viraler Genome mittels qRT-PCR Verfahren wie unter 4.5.4 beschrieben, ermittelt (Fig. 21C). Konsistent mit den Ergebnissen der PCR-Analysen (Fig. 21B) konnte ein Anstieg der Anzahl viraler Genome 48 h p.i. beobachtet werden (Abb. 21C). Da frühere Untersuchungen keinen Unterschied in der Replikation der viralen DNA zwischen Wildtypvirus und E1B-55K deletierten Viren feststellten (Goodrum *et al.*, 1997; Leppard *et al.*, 1989; Pilder *et al.*, 1986b; Williams *et al.*, 1986), kann man einen direkten Einfluss der Interaktion von Daxx mit E1B-55K auf die Repression der DNA Synthese ausschliessen.

Um die Rolle von Daxx als Repressor des viralen Lebenszyklus genauer zu analysieren wurden im folgenden Schritt, Expressionsmuster früher und später viraler Proteine untersucht (Abb. 22). Dazu wurden die pseudo-primären Hep-Zellen mit unterschiedlichen Mengen Ad5-Wildtypvirus H5pg4100 infiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Zum Nachweis der frühen (Abb. 22A) und späten (Abb. 22B) viralen Proteine wurden *Western Blot* Analysen durchgeführt. In diesen Untersuchungen sollten die Expressionsmengen der verschiedenen Proteine abhängig von der Daxx Anwesenheit untersucht werden.

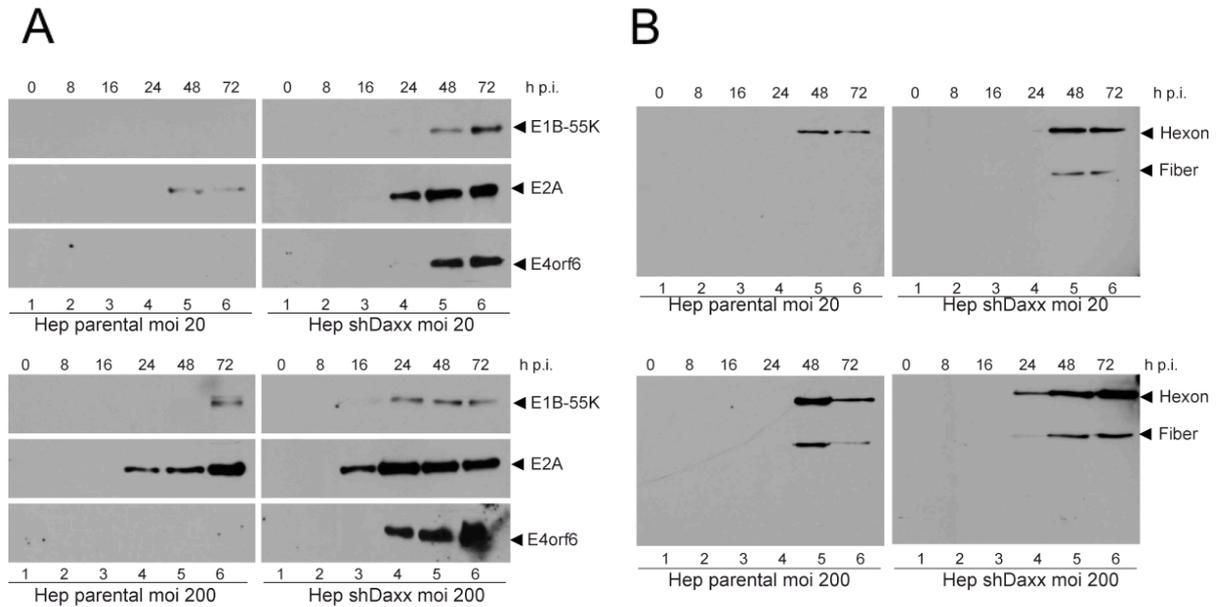


Abb. 22 Analysen zur Produktion viraler Proteine in infizierten Zellen

Hep parental- und Hep shDaxx-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen H5pg4100 infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet. Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht-infiziert (mock). Zur Überprüfung der Expression wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (5 µg bei E2A, Hexon, Penton und Fiber oder 30 µg bei E1A, E1B-55K, E4orf6) auf 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert (4.6.4). Der Nachweis erfolgte mit dem α -Maus-E1A, -E2A, -E1B Antikörper und dem Kaninchen-Serum α -late, das für mehrere virale Strukturproteine spezifisch ist.

Interessanterweise konnte man bei dieser Analyse beobachten, dass die Genprodukte der frühen Transkriptionseinheiten 1 (E1B), 2 (E2A) und 4 (E4orf6) in den shDaxx Zellen, im Vergleich zur Daxx-positiven Zelllinie, deutlich verstärkt exprimiert werden. Bei einer moi von 20 ist in Wildtyp-infizierten shDaxx Zellen bereits 16 h p.i. eine E1A und E2A Proteinsynthese sowie 48 h p.i. ebenfalls E1B und E4orf6 nachweisbar (Fig. 22A). In der parentalen Zelllinie scheint die Expression um etwa 24 h verzögert zu sein. Dieser starke Defekt wird durch die Erhöhung der Anzahl der eingesetzten infektiösen Viruspartikel (moi 200) vermindert, allerdings kann der Unterschied zur Daxx-negativen Zelllinie dadurch nicht vollständig kompensiert werden (Abb. 22A). Bei der Untersuchung später viraler Strukturproteine konnte ein ähnlicher, jedoch nicht so stark ausgeprägter Unterschied festgestellt werden (Abb. 22B). Die Infektion unterschiedlicher Mengen Wildtypvirus zeigte ebenfalls eine Abhängigkeit vom Vorhandensein des zellulären Faktors Daxx in beiden Zelllinien. Die Anwesenheit von Daxx führt zu einer verzögerten und verminderten Expression von Hexon und Fiber

(Abb. 22B). Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Defekt in der Expression später Proteine eine Folge verminderter Synthese früher viraler Proteine ist. Im Ganzen deutet diese Beobachtungen stark darauf hin, dass Daxx die Expression früher und möglicherweise damit auch später viraler Proteine reprimiert. Dieser Befund steht im Einklang mit der Annahme, dass Daxx ein zellulärer Repressor der Ad5-Replikation ist. Zusammenfassend konnten die Untersuchungen zur Synthese viraler Proteine, Produktion von Nachkommenviren und Synthese adenoviraler DNA zeigen, dass Daxx die Ad5-Replikation negativ beeinflusst.

Es stellt sich nun die Frage, ob diese Repression auch auf der Ebene viraler mRNAs nachweisbar ist. Dazu wurden erneut Hep parental- und Hep shDaxx-Zellen mit Wildtypvirus H5pg4100 infiziert und nach 12 sowie 36 h p.i. geerntet. Die mRNA wurde wie unter 4.5.2 beschrieben aus Zytoplasma und Zellkern isoliert und anschließend mittels Reverser Transkriptase in cDNA übersetzt. Durch qRT-PCR Analysen mit geeigneten Oligonukleotiden konnten relative Synthesemengen der E1B-55K, E2A und Hexon mRNAs bestimmt werden. Die zelluläre 18S rRNA diente bei den Untersuchungen als interne Kontrolle. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der Image-Software (Abramoff *et al.*, 2004) quantifiziert und sind in Abb. 23 dargestellt. In Übereinstimmung mit den Daten dieser Arbeit zeigte die Auswertung der Ergebnisse für die frühen Transkriptionseinheiten E1B und E2A eine verminderte mRNA Menge in Daxx-exprimierenden Zellen im Vergleich zur Hep shDaxx Zelllinie. Unter Betrachtung der E1B mRNA-Synthese, konnte man feststellen, dass ein Daxx-abhängiger reprimierender Effekt bereits 12 h p.i. zu erkennen ist. Dagegen ist ein Unterschied der E2A mRNA-Synthese in den untersuchten Zelllinien erst nach 36 h nachweisbar. Konsistent mit den Expressionsdaten der viralen Proteine konnte auch für das Hexon Genprodukt nach 36 h eine gesteigerte mRNA Synthese in Abwesenheit von Daxx festgestellt werden (Abb. 23). Die Vermutung liegt nahe, dass dieser Effekt erneut auf die verminderte Expression früher viraler Proteine zurückgeführt werden kann.

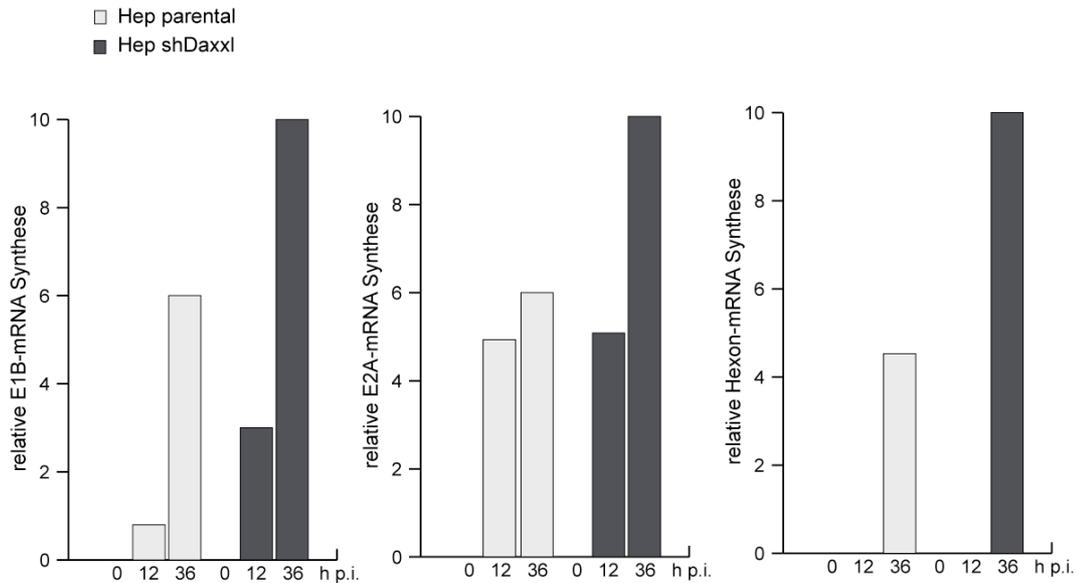


Abb. 23 Analysen zur viralen mRNA-Synthese in infizierten humanen Hep-Zellen

Hep parental- und Hep shDaxx-Zellen wurden mit Ad5-Wildtypvirus H5pg4100 (moi 20) infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet. Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht-infiziert (mock). Mit Hilfe von qRT-PCR (4.5.4) konnten die Mengen der synthetisierten mRNAs ermittelt werden.

Es lässt sich anhand der Ergebnisse annehmen, dass Daxx die Transkription bestimmter viraler Genabschnitte reprimiert und folglich die Expression früher viraler Proteine vermindert wird. Dies könnte der Grund für die verminderte Produktion von Nachkommenviren und dem verzögerten Ad5-Replikationszyklus in Daxx-positiven Hepatozyten sein.

Im Ganzen bestätigt diese Untersuchung die Annahme, dass der zelluläre Faktor Daxx nicht nur in transformierten, humanen Tumorzelllinien sondern auch in primären, humanen Hepatozyten die adenovirale Replikation negativ beeinflusst.

5.2.5 Etablierung und Charakterisierung einer Daxx-rekonstituierten Zelllinie

Zur weiteren Überprüfung der reprimierenden Eigenschaften von Daxx auf die Ad5-Replikation wurde der zelluläre Faktor in die Daxx-negative Hep Zelllinie rückkloniert, um einen möglicherweise veränderten Phänotyp zu ermitteln. Dazu wurde ein shRNA-resistentes Expressionsplasmid für Daxx generiert und über lentivirale

Vektoren in die Hep shDaxx-Zellen transduziert (Roger Everett, Glasgow). In die Daxx cDNA (5'GGAGTTAGATCTGAGCGAA) wurden mehrere stille Punktmutationen eingeführt, um die Resistenz gegen die Daxx-spezifische shRNA (5'GGAGTTGGATCTCTCAGAA; Michaelson *et al.*, 2003) zu gewährleisten. Um endogenes und exogenes Daxx zu unterscheiden, wurde in das Expressionsplasmid ein GFP- (*green fluorescent protein*-) Epitop eingesetzt.

Im ersten Schritt wurden die Expressionsmengen des zellulären Faktors in den generierten Zelllinien untersucht (Abb. 24A). Dazu wurden Gesamtzellextrakte über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und *Western Blot* Analysen durchgeführt (Abb. 25A, Roger Everett, Glasgow/UK). Die Beobachtungen zeigten, dass die behandelten Daxx-negativen (Hep shDaxx/re Daxx) und parentalen Zellen (Hep parental/reDaxx) nun GFP-markiertes Daxx exprimieren, welches aufgrund eines höheren Molekulargewichts nun ein langsames Laufverhalten im SDS-Gel zeigt (Abb. 24A, Spur 4). Zur Kontrolle wurden zusätzlich die Daxx-Gleichgewichtsmengen in den parentalen und shDaxx Zelllinien mittels *Western Blot* überprüft. Endogenes Daxx (Abb. 24A, Spur 1) sowie dessen verminderte Expression in Daxx-depletierten Zellen (Abb. 24A, Spur 3) konnten erneut nachgewiesen werden. Daraufhin wurde, wie in 5.2.2 beschrieben, die Nachkommenvirenproduktion in Hep parental, Hep shDaxx sowie Hep shDaxx/reDaxx untersucht. Zur Durchführung dieser Analyse wurden die verschiedenen Zelllinien mit Wildtypvirus H5pg4100 infiziert. Die Zellen wurden 36 h p.i. geerntet um die Syntheserate der Viruspartikel zu ermitteln (Abb. 24B).

Die Ergebnisse zeigen konsistent mit den bereits beschriebenen Daten dieser Arbeit eine siebenfach-erhöhte Nachkommenvirenproduktion in infizierten Zellen ohne Daxx (Abb. 24B). Durch Rekonstitution einer stabilen Daxx-Expression (Hep reDaxx) kann die verstärkte Virussyntese zumindest teilweise reprimiert werden (Abb. 24B). Die Daten zeigen eine Hemmung der Ad5 Synthese um den Faktor 2,5 im Vergleich zur Daxx-negativen Zelllinie. Dies unterstützt erneut die Annahme, dass zelluläres Daxx einen reprimierenden Effekt auf die Ad5-Replikation hat.

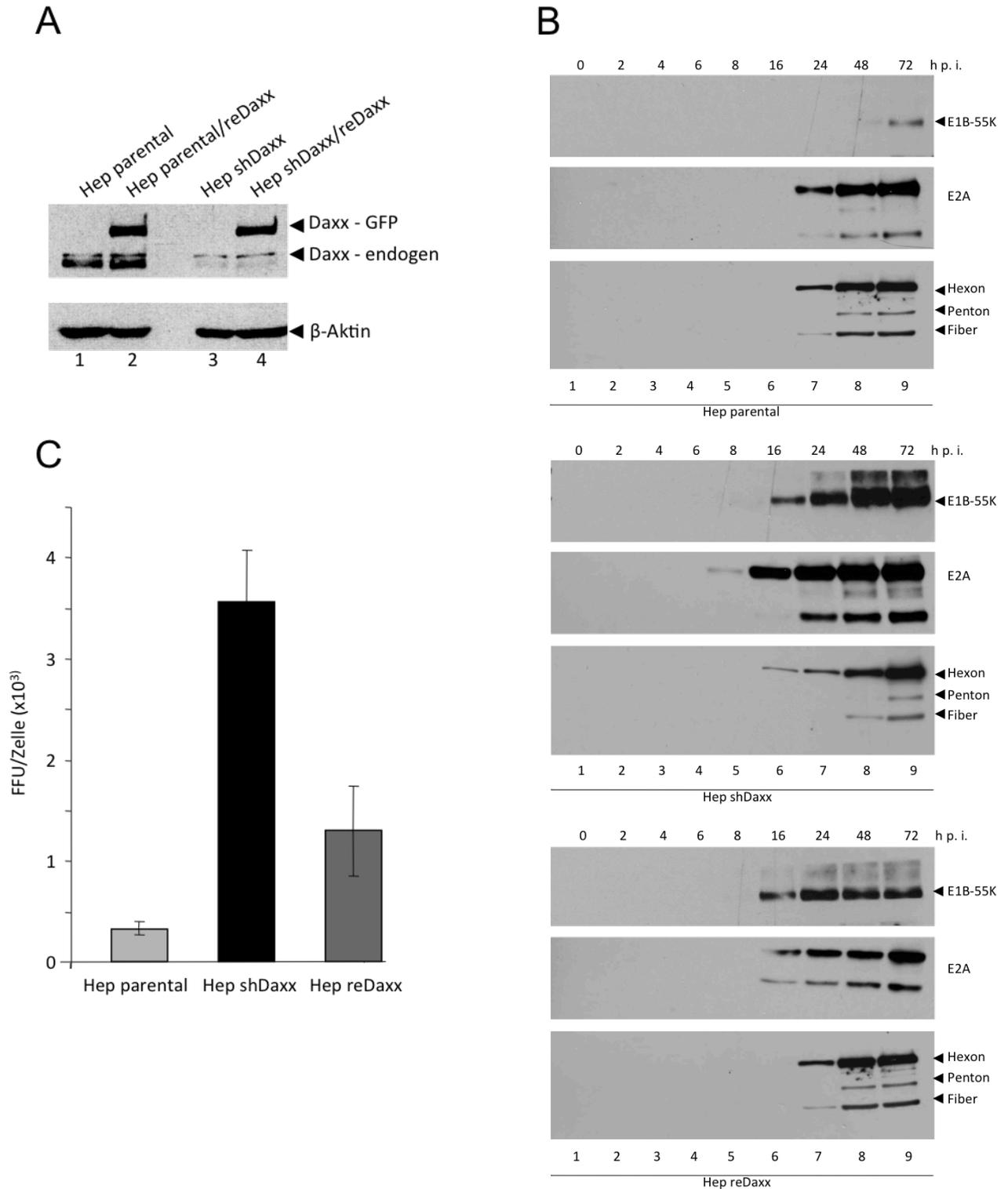


Abb. 24 Charakterisierung einer Daxx-rekonstituierten humanen Hep-Zelllinie

A. Aus den Hep parental-, Hep shDaxx- und Hep reDaxx-Zellen wurden Gesamtzellextrakte hergestellt, jeweils gleiche Mengen Protein (100 μ g bei Daxx oder 30 μ g bei β -Aktin) auf 10%igen (Daxx) und 12%igen (β -Aktin) SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert (4.6.4). Der Nachweis erfolgte mit dem α -Kaninchen Daxx und α -Maus β -Aktin Antikörper. B. Hep parental-, Hep shDaxx- und Hep reDaxx-Zellen wurden mit dem Ad5-Wildtypvirus H5pg4100 (moi 20) infiziert

und nach unterschiedlichen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet. Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht-infiziert (mock). Zur Überprüfung der Expression wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (5 µg bei E2A, Hexon, Penton und Fiber; 30 µg bei E1B-55K) auf 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert (4.6.4). Der Nachweis erfolgte mit dem α -Maus E2A, α -Maus E1B und dem Kaninchen-Serum α -late, das für mehrere virale Strukturproteine spezifisch ist. C. Zur Bestimmung der Ausbeute an Nachkommenviren wurden Hep parental-, Hep shDaxx- und Hep reDaxx-Zellen mit dem Ad5-Wildtypvirus H5pg4100 (moi 50) infiziert. Die Zellen wurden 36 h p.i. geerntet und Nachkommenviren isoliert (4.3.5). Anschließend erfolgte eine Titration auf 293-Zellen (4.3.3).

Als nächstes stellte sich die Frage, ob in infizierten Hep reDaxx-Zellen die Proteinexpression verändert wird. Dazu wurden zunächst alle Zelllinien mit Wildtypvirus infiziert und *Western Blot* Analysen zur Detektion der frühen viralen Proteine (E1B-55K, E2A) und späten Strukturproteine (Hexon, Penton, Fiber) gemacht (Abb. 24C). Die Auswertung der Versuche ergab konsistent mit der zuvor durchgeführten Analyse, dass frühe und späte virale Proteine vermehrt exprimiert werden, wenn Daxx fehlt (Hep shDaxx). Durch Rückführung des zellulären Faktors kann der Phänotyp nicht komplett rekonstituiert werden. Interessanterweise kann in infizierten Hep reDaxx-Zellen eine reduzierte E1B-55K- und E2A-Proteinmenge gegenüber der Daxx-negativen Zellen beobachtet werden (Abb. 24C).

Dies zeigt, dass Daxx in sehr engem Zusammenhang mit der negativen Regulation der Nachkommenvirusproduktion und Expression viraler Proteine steht.

5.2.6 Daxx beeinflusst den Abbau von p53

E1B-55K bildet zusammen mit E4orf6 und einer Reihe weiterer zellulärer Komponenten eine E3-Ubiquitinligase, die den proteasomalen Abbau des zellulären Tumorsuppressors in Wildtypvirus-infizierten Zellen steuert (Blanchette *et al.*, 2004; Grand *et al.*, 1994; Harada *et al.*, 2002; Querido *et al.*, 2001; Querido *et al.*, 1997a; Ridgway *et al.*, 1997; Steegenga *et al.*, 1998).

Um zu testen, ob die Anwesenheit von Daxx Auswirkungen auf diesen Mechanismus hat, wurden Hep parental- und Hep shDaxx-Zellen mit unterschiedlichen Mengen Wildtypvirus (H5pg4100) infiziert, nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet, lysiert und Gesamtzellextrakte hergestellt. Zum Nachweis des p53-Abbaus wurden *Western Blot* Analysen durchgeführt (Abb. 25). Wie erwartet konnte in p53-negativen

H1299-Zellen kein Tumorsuppressor detektiert werden. Die Untersuchungen bei einer moi von 20 zeigten in infizierten shDaxx-Zellen nach 72 h eine schwache Reduktion der p53-Proteinmengen (Abb. 25, Hep shDaxx, Spur 6), wohingegen sich die p53-Proteinkonzentration in den parental Zellen nicht veränderte (Abb. 25, Hep parental, Spur 6). Die Infektion wurde erneut mit der zehnfachen Menge Viruspartikel wiederholt. Bereits 24 h p.i. konnte in der parental Zelllinie der Abbau des Tumorsuppressors beobachtet werden (Abb. 25, Hep parental, Spur 10, 11, 12).

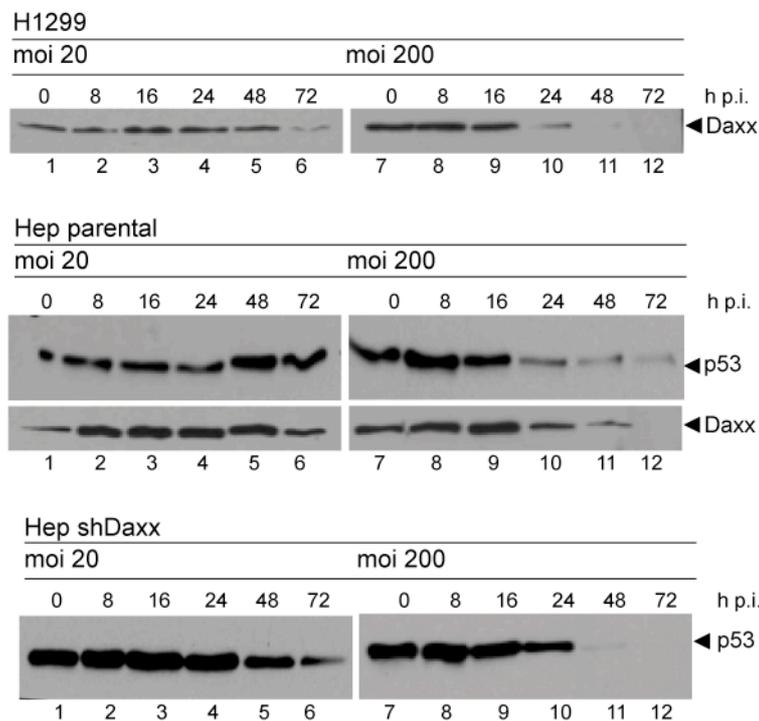


Abb. 25 Abbau von p53 in infizierten Zellen

H1299-, Hep parental- und Hep shDaxx-Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen H5pg4100 infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet. Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht-infiziert (mock). Es wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (100 μ g für Daxx und 50 μ g für p53) über 10%ige (Daxx) oder 12%ige (p53) SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt, auf Nitrozellulose mittels *Western Blot* transferiert und mit den Antikörpern gegen Daxx und p53 (DO-1) inkubiert.

Dieser Befund konnte in den Daxx-negativen Zellen reproduziert werden (Abb. 25, Hep shDaxx, Spuren 11 und 12), allerdings fiel auf, dass p53 bereits 48 h p.i. fast nicht mehr nachweisbar war. Eine einfache Erklärung für diese Beobachtungen ist vermutlich die verstärkte Expression von E1B-55K und E4orf6, der beiden viralen Komponenten der E3-Ubiquitinligase in den Hep shDaxx-Zellen (Abb. 25).

Im Ganzen zeigten diese Versuche, dass Daxx für den Abbau von p53 nicht essenziell ist und ihn sogar negativ beeinflusst. Ein weiteres, überraschendes Ergebnis wurde beim Vergleich der infizierten Zelllinien hinsichtlich der Daxx Expressionsmusters gemacht. Es konnte konsistent in allen untersuchten Zelllinien eine Reduktion von Daxx im Verlauf der Infektion festgestellt werden. Je nach Zelllinie und eingesetzter Virusmenge konnte eine Verminderung der Daxx-Gleichgewichtsmengen 24 bzw. 48 h p.i. beobachtet werden (Abb. 25). Diese negative Regulierung von Daxx wurde in einem weiteren Teil dieser Arbeit näher untersucht und im Abschnitt 5.3 beschrieben.

5.2.7 Daxx reprimiert den Ad5 E1B-Promotor

In abschließenden Reporter-genversuchen wurde überprüft, ob die E1B-Promotoraktivität von Daxx beeinflusst wird. Zur Durchführung dieser Analysen wurden zunächst Hep shDaxx-Zellen (Abb. 26), wie unter 4.5 beschrieben, mit dem Plasmidvektor pGL E1B-LUC, einem artifiziellen luziferaseabhängigen E1B-Promotorkonstrukt und unterschiedlichen Mengen eines Daxx-Expressionsplasmids, transfiziert (Abb. 26).

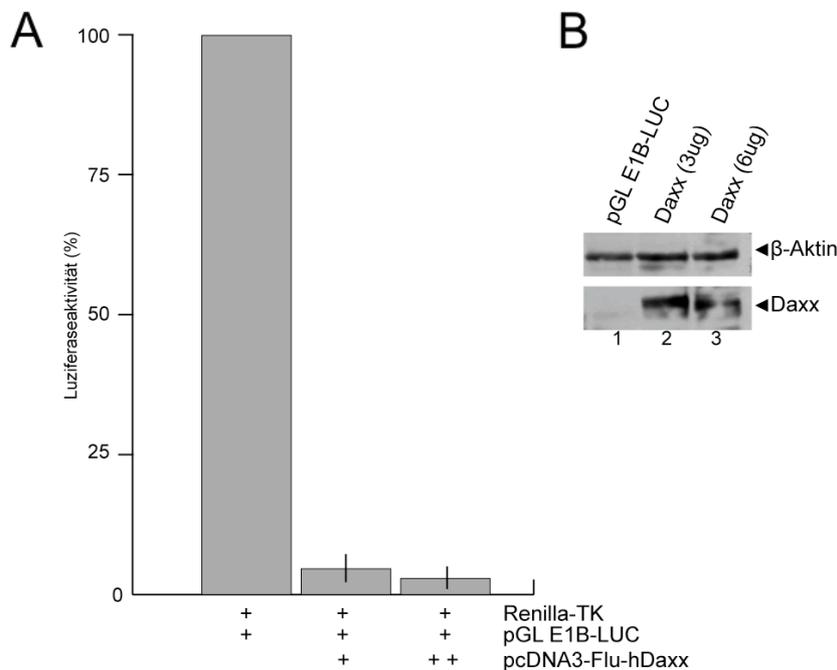


Abb. 26 Daxx-abhängige Repression von pGL E1B-LUC

Hep shDaxx-Zellen (A.) wurden in mit pRL-TK (interne Kontrolle), pGL E1B-LUC und unterschiedlichen Mengen Daxx (+3 μ g/++6 μ g; 4.6.7) nach der PEI-Methode transfiziert (4.2.4.1). 48 h p.t. wurden die Zellen mit Lyse-Puffer (Promega) aufgeschlossen und die *Firefly*-Luziferase-Aktivität mit dem *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega) bestimmt. Die *Firefly*-Luziferase-Aktivität des Reporterplasmids pGL E1B-LUC wurde als Positivkontrolle verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. B. Die Proteinproben aus dem Luziferase-Assay wurden über ein 10%iges SDS-Gel aufgetrennt und durch *Western Blot* auf Nitrozellulose übertragen (4.6.4), um die Gleichgewichtsmengen von Daxx und β -Aktin mit Hilfe der entsprechenden Antikörper zu bestimmen.

Nach 48 h wurde die Aktivität der *Firefly*-Luziferase luminometrisch bestimmt und die Messwerte gegen die interne *Renilla*-Luziferaseaktivität normalisiert. Die E1B-Promotoraktivität wurde auf 100% normiert. Interessanterweise zeigen die Ergebnisse, dass die Transkriptionsrate des Reportergens durch Daxx gehemmt wird (Abb. 26A). Unter den gewählten Bedingungen wurden in den Daxx-depletierten Zellen Restaktivitäten von etwa 5% im Vergleich zum Kontrollansatz ohne kotransfiziertes Daxx ermittelt. Durch Verdoppelung der exogenen Daxx Proteinmenge konnte diese Restaktivität auf bis zu 3% reduziert werden (Abb. 26A).

Im Ganzen weisen die Beobachtungen dieses Reporterassays stark darauf hin, dass Daxx eine Repressoraktivität hinsichtlich des viralen E1B-Promotors vermittelt. Daher lassen die Ergebnisse eine Daxx-abhängige Modulation des viralen E1B-55K auf DNA Ebene annehmen. Es liegt die Vermutung nahe, dass Daxx einen reprimierenden Einfluss auf die virale Replikation über die Hemmung der E1B-Transkription und folglich E1B-abhängiger Eigenschaften vermittelt. Um auszuschließen, dass die beschriebenen Phänotypen auf Unterschiede der Expressionsrate beruhen, wurden die Gleichgewichtsmengen dieser Proteine mit Gesamtzellextrakten aus den Reportergergenversuchen durch *Western Blot* Analysen bestimmt (Abb. 26B).

5.3 E1B-55K-vermittelte Reduktion von Daxx im Verlauf des produktiven Ad5-Replikationszyklus

Daxx konnte in dieser Arbeit bereits als zellulärer Repressor der adenoviralen Replikation identifiziert werden. Vermutlich stellt dieser Faktor eine essenzielle Komponente antiviraler Schutzmechanismen der Wirtszelle dar. Im folgenden Teil dieser Arbeit sollte Daxx im Verlauf der Virusinfektion genauer untersucht werden.

In vorhergehenden Untersuchungen konnte eine Reduktion des Daxx-Proteins in infizierten humanen pseudo-primären (Hep parental) und in Tumorzellen (H1299) beobachtet werden (Abb. 24). Interessanterweise konnte weiterhin eine Interaktion von Daxx mit E1B-55K bestätigt werden (Abb. 7). Es liegt die Vermutung nahe, dass E1B-55K mit E4orf6 und einer Reihe zellulärer Proteine wie Cullin-5, Rbx1/RCO1/Hrt1, Elongin B und C, als Ad5 E3-Ubiquitinligase-Komplex an der Reduktion von Daxx im Verlauf der Infektion beteiligt ist.

5.3.1 E1B-55K-abhängige, E4orf6-unabhängige Reduktion des Daxx-Proteins

Zunächst wurden Infektionsreihen mit Wildtyp (H5pg4100), E1B-negativen (H5pm4149) und E4orf6-negativen (H5pm4154) Viren durchgeführt. Dazu wurden A549-Zellen infiziert, aufgeschlossen und *Western Blot* Analysen durchgeführt. In Übereinstimmung mit zahlreichen Publikationen zeigten die Ergebnisse den Abbau von p53 nur in Wildtyp-infizierten Zellen (Abb. 27A, Spur 2). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass Daxx im Verlauf der Infektion E1B-55K-abhängig reduziert wird (Abb. 27A, Spur 2 und 4). Überraschenderweise und im Gegensatz zu klassischen Substraten der Ad5 E3-Ubiquitinligase konnten in H5pm4154-infizierten Zellen, die kein E4orf6 exprimierten, auch sehr geringe Daxx-Proteinlevel im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen beobachtet werden (Abb. 27A, Spur 4). Diese Daten lassen auf einen E1B-abhängigen, aber E4orf6-unabhängigen Abbauweg für das bisher noch unbekannt zelluläre Substrat Daxx schließen.

Aufgrund dieser hoch-interessanten Beobachtung wurde die E1B-55K-Abhängigkeit der Daxx-Reduktion in Ad5 transformierten Rattenzellen überprüft. Es ist bekannt, dass diese Zellen die viralen Proteine E1B-55K (AB120) und E1B-55K mit E4orf6 (ABS1) stabil exprimieren (Nevels, 1999; Nevels *et al.*, 1999). Aus Gesamtzellextrakten wurden *Western Blot* Analysen durchgeführt, um die Proteinmengen von Daxx und bekannter Substrate wie Mre11 und p53 zu ermitteln. Erneut konnte die Reduktion von Daxx bei Anwesenheit von E1B-55K (Abb. 27B, Spur 2 und 3) nachgewiesen werden (Abb. 27B, Spur 2). Wie erwartet wurden Mre11 und p53 dem proteasomalen

Abbau nur bei Anwesenheit beider viraler Komponenten zugeführt (Abb. 27B, Spur 3).

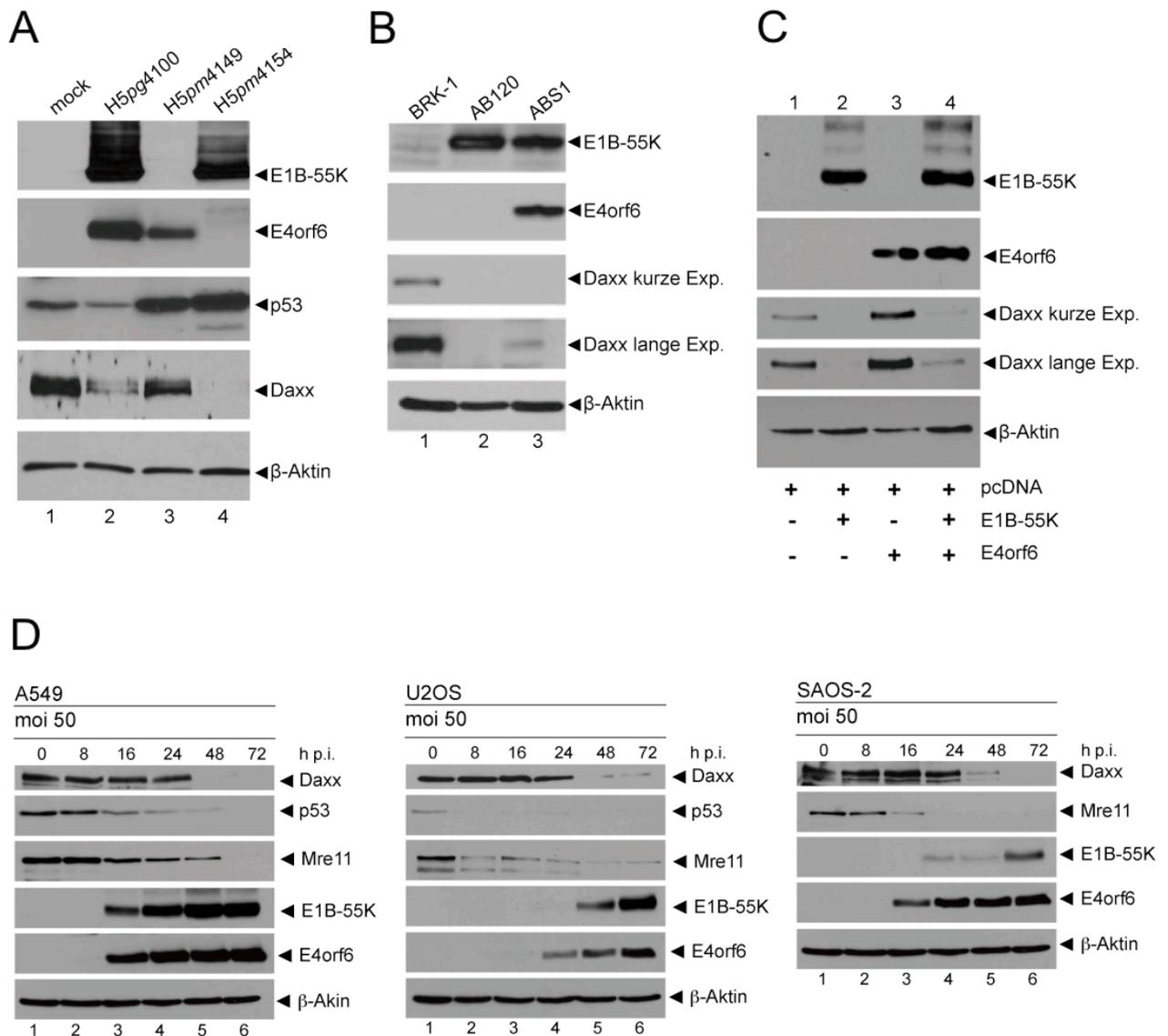


Abb. 27 Reduktion der Daxx-Gleichgewichtsmengen in infizierten, stabil transformierten und transfizierten Zellen

A. A549-Zellen wurden mit H5pg4100, H5pm4149 und H5pm4154 (moi 50) infiziert und 48 h p.i. geerntet. Mock bedeutet nicht-infiziert. Zur Überprüfung der Expression wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (50 µg bei E1B-55K, E4orf6, p53, β-Aktin und 100 µg bei Daxx) auf 12%igen (E1B-55K, E4orf6, p53, β-Aktin) und 10%igen (Daxx) SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert (4.6.4). Der Nachweis erfolgte mit den entsprechenden Antikörpern. B. Aus spontan immortalisierten BRK-1, stabil transformierten AB120- sowie ABS1-Rattenzellen wurden Gesamtzellextrakte hergestellt. Jeweils gleiche Mengen Protein (50 µg bei E1B-55K, E4orf6, β-Aktin und 100 µg bei Daxx) wurden mit Hilfe von 12%igen (E1B-55K, E4orf6, β-Aktin) und 10 %igen (Daxx) SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert (4.6.4). Der Nachweis erfolgte mit den entsprechenden Antikörpern. Zum Nachweis von p53 in Rattenzellen wurde der Kaninchen Antikörper Fl393 verwendet. C. H1299-Zellen wurden mit E1B-55K- und E4orf6-pcDNA3-Konstrukten nach der PEI-Methode transfiziert. 48 h p.t. wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und

Gesamtzellextrakte (50 µg bei E1B-55K, E4orf6, p53, β-Aktin und 100 µg bei Daxx) wurden über 12%ige (E1B-55K, E4orf6, p53, β-Aktin) und 10%ige (Daxx) SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert (4.6.4). Der Nachweis erfolgte mit den entsprechenden Antikörpern. D. A549-, U2OS- und SAOS-2-Zellen wurden mit H5pg4100 (moi 50) infiziert, nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und aufgeschlossen. Jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (50 µg bei E1B-55K, E4orf6, p53, Mre11, β-Aktin; 100 µg bei Daxx) auf 12%igen (E1B-55K, E4orf6, p53, Mre11 und β-Aktin) und 10%igen (Daxx) SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert (4.6.4). Der Nachweis erfolgte mit den entsprechenden Antikörpern.

Um die E1B-55K-abhängige Reduktion von Daxx in einem weiteren System zu überprüfen wurden Transfektionen durchgeführt. Dazu wurden H1299-Zellen mit pcDNA3-E1B-55K- und -E4orf6-Expressionsplasmiden transfiziert. 48 h p.t. wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und *Western Blot* Analysen durchgeführt. Die Beobachtung zeigte wie erwartet eine Reduktion der endogenen Daxx-Proteinkonzentration bei alleiniger Anwesenheit von E1B-55K (Abb. 27C Spuren 2 und 4). Konsistent mit den Ergebnissen der Infektionsreihen (Abb. 27A) und den Analysen der stabil transformierten Rattenzellen (Abb. 27B) ist festzuhalten, dass die Anwesenheit von E1B-55K zur effizienten Daxx-Reduktion ausreichend ist (Abb. 27C, Spur 2) und deswegen E4orf6-unabhängig zu sein scheint (Abb. 27C, Spur 4). Da die Expression weiterer viraler Genprodukte im Kontext der Transfektionsexperimente ausgeschlossen werden kann, bestätigen diese Daten die Annahme, dass E1B-55K zur Reduktion von Daxx ausreicht. Dieser Befund lässt unterschiedliche Mechanismen der Daxx-Reduktion im Verlauf der Ad5 Infektion vermuten. Möglicherweise stellt Daxx ein weiteres zelluläres Substrat der E1B-55K/E4orf6-E3-Ubiquitinligase dar oder wird durch einen weiteren noch unbekanntem E1B-55K-abhängigen, E4orf6-unabhängigen Abbauweg degradiert.

Um aufzuklären, ob die Daxx-Reduktion nach Wildtypvirusinfektion zelllinien-spezifisch ist, wurden im nächsten Schritt A549-, U2OS- und p53-negative SAOS-2-Zellen mit H5pg4100 infiziert, Gesamtzelllysate hergestellt und *Western Blot* Analysen durchgeführt (Abb. 27D). Es konnten in jeder untersuchten Zelllinie nach etwa 48 h p.i. reduzierte Daxx-Proteinkonzentrationen beobachtet werden (Abb. 27D, Spuren 5). Bereits 16 h p.i. konnte man in A549-Zellen den Abbau von p53 nachweisen (Abb. 27D, Spur 3). Dagegen wurde in U2OS-Zellen schon in nicht-infizierten Zellen sehr geringe p53-Mengen detektiert (Abb. 27D, Spur 1). Der Ad5 E3-Ubiquitinligase-vermittelte Abbau von Mre11 konnte in A549-Zellen erst 48 h p.i. festgestellt werden

(Abb. 27D, Spur 5). Da die Expressionsmengen von E1B-55K und E4orf6 in infizierten U2OS-Zellen geringer als in infizierten A549-Zellen war, ist es nicht überraschend, dass auch der Mre11-Abbau in diesen Zellen erst 48 h p.i. nachweisbar war (Abb. 27D, Spur 5). In den infizierten SAOS-2 Zellen konnte 16 h p.i. bereits der Abbau von Mre11 beobachtet werden (Abb. 27D, Spur 3). Dies scheint mit der Expression der beiden Ligasekomponenten E1B-55K und E4orf6 einherzugehen (Abb. 27D, Spur 3). Die Daxx-Reduktion erfolgt 48 h p.i., sehr spät im Vergleich zu Mre11.

Im Ganzen konnte man durch diese Analyse feststellen, dass die Reduktion von Daxx in verschiedenen Zelllinien nachweisbar ist. Der Abbau von Daxx konnte für die untersuchten infizierten Zelllinien nach etwa 48 h p.i. reproduzierbar nachgewiesen werden.

5.3.2 E4orf3 und die BC-Box von E4orf6 haben keinen Einfluss auf den Abbau von Daxx

Um die Beteiligung der bekannten E1B-55K/E4orf6-E3-Ubiquitinligase und E4orf3 an der Daxx-Reduktion genauer zu untersuchen, wurden weitere Infektionsreihen durchgeführt. Dazu wurden Virusmutanten untersucht, die ein verändertes E4orf6-Protein exprimieren (H5pm4139), dass durch eine eingeführte Mutation in der BC-Box keine Interaktion mit Elongin B und C eingehen kann und somit die korrekte Assemblierung der Ad5 E3-Ubiquitinligase nicht unterstützt (Blanchette *et al.*, 2004). Der Einfluss von E4orf3 wurde mit entsprechenden Nullmutanten genauer analysiert.

H1299-Zellen wurden mit Ad5 Wildtyp H5pg4100, E1B- (H5pm4149), E4orf6- (H5pm4154), E4orf3- (H5pm4150), E4orf3/6- (H5pm4155) negativen Viren sowie mit der E4orf6 BC-Box Mutante (H5pm4139) infiziert. Wie die *Western Blot* Analysen zeigten, wurde Mre11 wie erwartet durch die Ad5 E3-Ubiquitinligase dem proteasomalen Abbau zugeführt und E1B-55K-, E4orf6-abhängig proteasomal abgebaut (Abb. 28, Spur 2 und 5). Interessanterweise zeigten diese Ergebnisse zusätzlich einen Abbau von Daxx in Wildtyp- (Abb. 28, Spur 2), H5pm4154- (Abb. 28, Spur 4), H5pm4150- (Abb. 28, Spur 7) und H5pm4139-infizierten Zellen (Abb. 28, Spur 7).

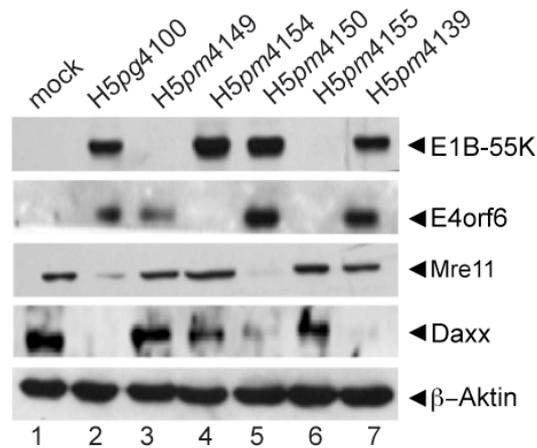


Abb. 28 E1B-55K-abhängige Reduktion von Daxx in infizierten Zellen

H1299-Zellen wurden mit H5pg4100, sowie den Virusmutanten H5pm4149, H5pm4154, H5pm4150, H5pm4155 und H5pm4139 infiziert (moi 50) (4.3.4), 20 h p.i. geerntet (4.2.5) und wie unter 4.5.2 beschrieben lysiert. Zur Überprüfung der Expression wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (100 µg für Daxx, 50 µg für E1B-55K, E4orf6, Mre11 und β-Aktin) mittels 12%iger (E1B-55K, E4orf6, Mre11 und β-Aktin) oder 10%iger (Daxx) SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt, durch *Western Blot* auf Nitrozellulose übertragen und mit entsprechenden Antikörpern inkubiert (4.6.4).

Dies bedeutet, dass auch E4orf3 keine Rolle bei der Daxx-Reduktion spielt. Aufgrund des starken Defekts in der Expression von E1B-55K kann Daxx in H5pm4155-infizierten Zellen nicht reduziert werden (Abb. 28, Spur 6). Weiterhin bestätigt dieser Befund, dass Daxx im Gegensatz zu Mre11 unabhängig von einer intakten BC-Box im E4orf6-Protein und damit unabhängig von der korrekten Assemblierung der Ad5 E3-Ubiquitinligase degradiert werden kann (Abb. 28, Spur 7). Dieses interessante Ergebnis unterstützt die Annahme, dass der proteasomale Daxx Abbau neben der klassischen Ad5 E1B-55K/E4orf6-abhängigen E3-Ubiquitinligase auch über eine weitere E1B-abhängige, E4orf6-unabhängige E3-Ligase vermittelt wird.

5.3.3 Die Inhibition der zellulären 26S Proteasomen verhindert den proteolytischen Abbau von Daxx

In Eukaryoten sorgt das Proteasom als intrazellulärer multikatalytischer Komplex für den Proteinabbau und somit für ein Proteinmilieu, dass an die Anforderungen der Zelle angepasst ist. In eukaryotischen Zellen sind die 26S Proteasomen die wichtigsten Vertreter im proteasomalen, Ubiquitin-abhängigen Abbauweg (Hershko *et al.*, 1998).

Bevor es zur Degradation kommt, muß ein Protein mit Ubiquitin (Ubi) gekennzeichnet werden. Dieser Vorgang geschieht durch ATP-abhängige Ubiquitinylierung. Die 19S-Untereinheit des Proteasoms erkennt diese Markierung, löst die Kette wieder ab und übergibt das entfaltete Protein an die 20S-Untereinheit. Diese sorgt daraufhin für die Spaltung des Proteins in Peptide von 3-12 AS Länge (Goldberg *et al.*, 1997; Hershko *et al.*, 1998). Fast 80% aller intrazellulären Proteine werden so durch die Proteasomen reguliert.

Um zu überprüfen, ob an der beobachteten E1B-55K-abhängigen Reduktion des zellulären Daxx, ein proteasomaler Abbauweg beteiligt ist, wurden H1299-Zellen mit Ad5-Wildtypvirus H5pg4100, H5pm4149 und H5pm4154 infiziert. 8 h vor der Zellernte wurde dem Medium der synthetisch hergestellte Inhibitor MG-132 zugesetzt, welcher reversibel die β 1- und β 2-Untereinheiten des Proteasoms hemmt. Zum Nachweis der Gleichgewichtsmengen wurden *Western Blot* Analysen durchgeführt (Abb. 29). In behandelten (Abb. 29A) und unbehandelten (Abb. 29B) H1299-Zellen synthetisieren alle untersuchten Viren je nach eingeführter Mutation nahezu die gleichen Mengen der viralen Proteine E1B-55K und E4orf6. Wie erwartet konnte gezeigt werden, dass Mre11 nur in Wildtyp-infizierten Zellen degradiert wird (Abb. 29A, Spur 2). Diese Analyse zeigt eine Hemmung des Abbaus unter Zugabe von MG-132 (Abb. 29B, Spur 2). Diese Beobachtung korreliert mit früheren Untersuchungen die zeigen, dass Mre11 über die adenovirale E1B-55K/E4orf6-E3-Ubiquitinligase dem proteasomalen Abbau zugeführt wird (Stracker *et al.*, 2002).

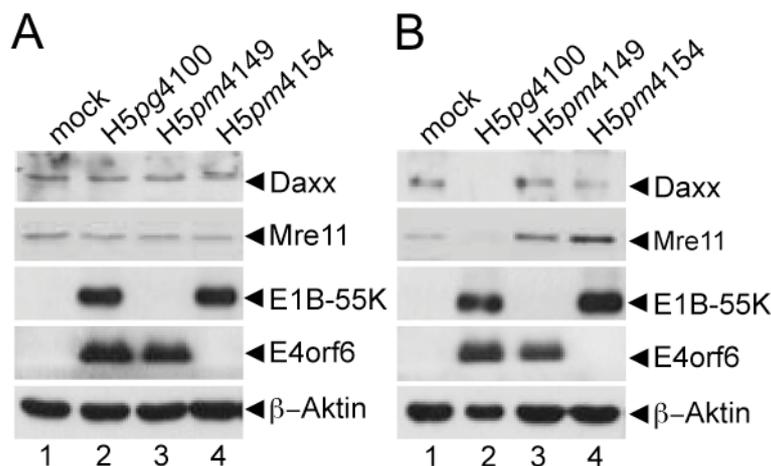


Abb. 29 Abbau von Daxx in Abhängigkeit des zellulären Proteasomeninhibitors MG-132 in infizierten H1299-Zellen

H1299-Zellen mit (A) und ohne (B) MG-132 Behandlung (20mM) wurden mit H5pg4100, H5pm4149 und H5pm4154 (moi 50) infiziert und 20 h p.i. geerntet. Mock bedeutet nicht-infiziert. Zur Überprüfung der Expression wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (50 µg bei Mre11, E1B-55K, E4orf6 und 100 µg bei Daxx) auf 12%igen (Mre11, E1B-55K und E4orf6) und 10%igen (Daxx) SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert (4.6.4). Der Nachweis erfolgte mit den entsprechenden Antikörpern.

Konsistent zu den Untersuchungen in A549-Zellen (Abb. 27A) konnte hier ebenfalls eine Reduktion der Daxx-Gleichgewichtsmenge in H5pg4100- sowie in H5pm4154-infizierten Zellen bei Abwesenheit von E4orf6 detektiert werden (Abb. 29B, Spuren 2 und 4). Interessanterweise konnte dies nach MG-132 Behandlung nicht mehr beobachtet werden (Abb. 29A, Spur 2 und 4). Diese Daten unterstützen die Annahme, dass Daxx während der adenoviralen Infektion über einen Proteasomen-abhängigen Abbauweg E1B-abhängig degradiert wird.

5.3.4 E1B-55K beeinflusst die Ubiquitylierung von Daxx

Als Ubiquitylierung bezeichnet man die Modifikation von Proteinen durch Ubiquitin. Dieser Mechanismus wird von drei Enzymen katalysiert, die nach der Reaktionsfolge als E1, E2 und E3 bezeichnet werden (Abb. 30). Im ersten Schritt wird Ubiquitin durch eine Thioesterbindung zwischen einem Cystein des E1-Enzyms und der C-terminalen Carboxylgruppe des Ubiquitins gebunden und in einen energetisch günstigen Zustand gebracht. Anschließend wird das Ubiquitin an das Enzym E2 überführt. Im letzten Schritt erfolgt die Übertragung des Ubiquitin durch die E3-Ligase auf das Subtrat (Cadwell *et al.*, 2005; Ciechanover *et al.*, 2004).

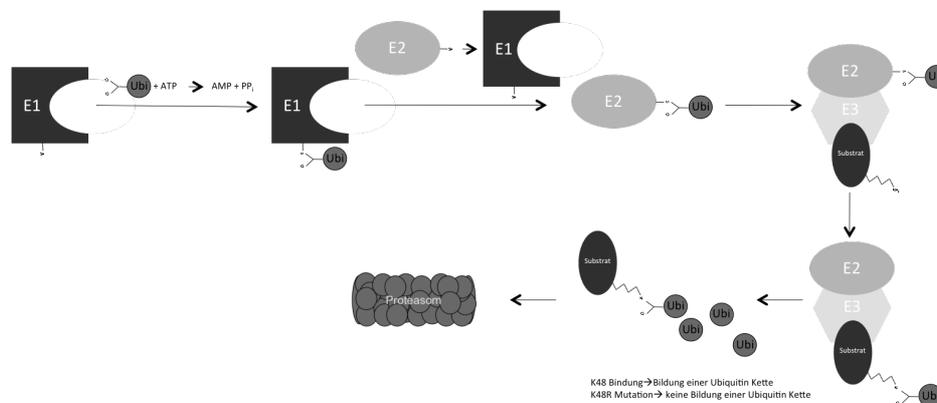


Abb. 30 Mechanismus der Ubiquitylierung eines Zielproteins

E1: Ubiquitin aktivierendes Enzym; E2: Ubiquitin übertragendes Enzym, E3: Ubiquitinligase, Ubi: Ubiquitin (Cadwell et al., 2005; Ciechanover et al., 2004). Detaillierte Erklärung siehe Text.

Um nun den Einfluss viraler Proteine auf die Ubiquitylierung von Daxx näher zu untersuchen, wurden Zellen verwendet, die ein GFP- und His-Epitop tragendes Ubiquitinkonstrukt stabil überexprimieren (H1299 Ubi). Zur Kontrolle wurde dieselbe Zelllinie mit eingeführter Mutation im Ubiquitin-Leserahmen (K48R) generiert (H1299 Ubi K48R). Dadurch ist mehrfaches Ankonjugieren weiterer Ubiquitinmoleküle an Substratproteine, zu einer kettenähnlichen Struktur, nicht mehr möglich und der proteasomale Abbau kann nicht stattfinden. Die Ubi-Zellen wurden mit Ad5-Wildtypvirus H5pg4100 sowie den Virusmutanten H5pm4149, H5pm4154 und H5pm4150 infiziert. Zum Nachweis der Gleichgewichtsmengen, die zur Koimmunpräzipitation eingesetzt wurden, wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und *Western Blot* Analysen durchgeführt (Abb. 31A).

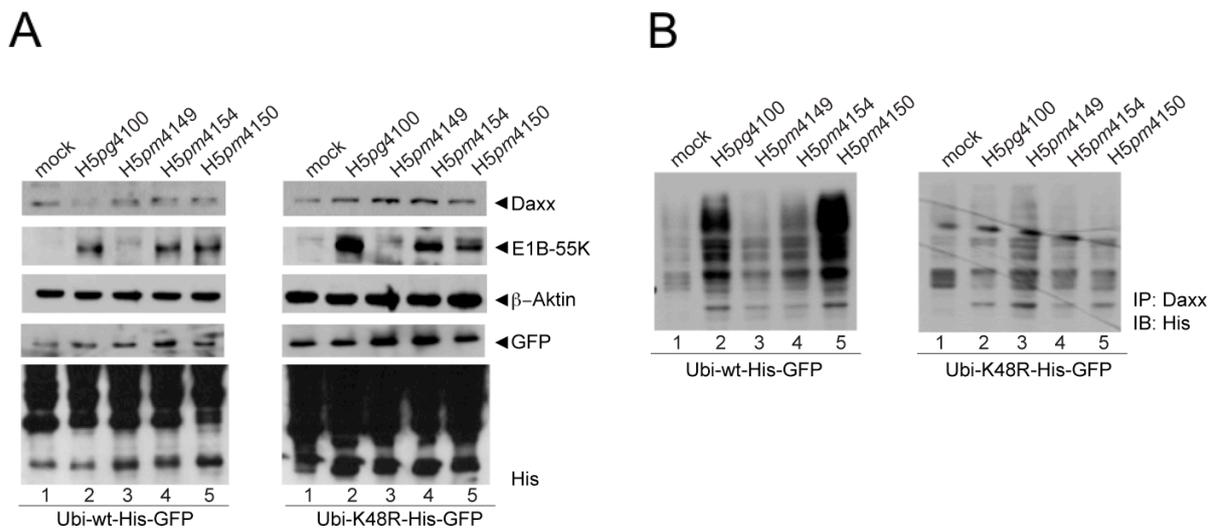


Abb. 31 Ubiquitin-Modifikation von Daxx in Abhängigkeit von E1B-55K

H1299-Zellen, die Wt-Ubi- und ein punktmutiertes Ubi-K48R-Konstrukt mit zuvor eingeführtem His- und GFP-Epitop überexprimieren, wurden mit H5pg4100, H5pm4149, H5pm4150 und H5pm4154 (moi 50) infiziert und 20 h p.i. geerntet. Mock bedeutet nicht-infiziert. A. Zur Überprüfung der Expression wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (50 µg bei E1B-55K, GFP, Histidin und β-Aktin und 100 µg bei Daxx) auf 12%igen (E1B-55K, GFP, Histidin und β-Aktin) und 10%igen (Daxx) SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert (4.6.4). Der Nachweis erfolgte mit den entsprechenden Antikörpern. B. Zur Koimmunpräzipitation wurde 1 mg Zellysate mit dem Daxx-Antikörper immunpräzipitiert (4.6.5) und dann über 12%ige SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen Histidin inkubiert.

Die GFP- und Histidinimmunfärbungen zeigen vergleichbare Expressionsmengen von Ubiquitin innerhalb der jeweiligen Zelllinien bei Infektion mit den unterschiedlichen Viren. Weiterhin konnte konsistent mit den bereits durchgeführten Untersuchungen gezeigt werden, dass Daxx bei Anwesenheit von E1B-55K (H5pm4154) und in Kombination mit E4orf6 (H5pg4100) reduziert wird (Abb. 31A, linke Seite). Interessanterweise wird diese Reduktion durch eine Mutation im Ubiquitin-Leserahmen, welche zum Verlust des proteasomalen Abbaus führt, gehemmt (Abb. 31A, rechte Seite). Dies ist ein erster Hinweis für einen Ubiquitin-abhängigen Abbaumechanismus von Daxx. In einem weiteren Schritt wurde eine Koimmunpräzipitationsanalyse durchgeführt. Gesamtzelllysat wurde hergestellt und mit dem Daxx-Antikörper immunpräzipitiert. Anschließend konnte mittels *Western Blot* und Immundetektion mit einem Histidinantikörper ubiquitinyliertes Daxx dargestellt werden (Abb. 31B, linke Seite). Es konnte gezeigt werden, dass sich die Ubiquitin-Modifizierung je nach Virusmutanten ändert. Allgemein scheint die Anwesenheit von E1B-55K (H5pg4100, H5pm4150 und H5pm4150) zu einer verstärkten Ubiquitinpräzipitation durch Daxx zu führen im Vergleich H5pm4149- und nicht-infizierten Zellen. Wie erwartet ist die Ubiquitin-Konjugation an Daxx in der K48R-Zelllinie defekt (Abb. 31B, rechte Seite).

Allgemein zeigten diese Experimente, dass die Reduktion der Daxx-Gleichgewichtsmengen in Adenovirus-infizierten Zellen auf einen E1B-55K- und Ubiquitin-abhängigen, proteasomalen Abbauweg zurückzuführen ist. Es stellte sich nun die Frage, nach der Zusammensetzung der beteiligten E3-Ubiquitinligase.

5.3.5 Der proteolytischer Abbau von Daxx ist Cullin-5-abhängig

Bisher konnten zahlreiche Veröffentlichungen zeigen, dass E1B-55K zusammen mit E4orf6 und einer Reihe weiterer zellulärer Proteine wie Cullin-5, Rbx1/RCO1/Hrt1, Elongin B und C eine SCF-ähnliche E3-Ubiquitinligase bildet, deren Funktion die Ubiquitinylierung von Substratproteinen ist. Dabei stellt E4orf6 die Verbindung zur zellulären Plattform her, während E1B-55K vermutlich als Substratlieferant dient (Blanchette *et al.*, 2004; Harada *et al.*, 2002; Querido *et al.*, 2001). Mit p53, Mre11, DNA

Ligase IV und der Integrin $\alpha 3$ -Untereinheit konnten bisher einige zelluläre Interaktionspartner von E1B-55K als Zielproteine der Adenovirus-induzierten E3-Ubiquitinligase nachgewiesen werden (Baker *et al.*, 2007; Dallaire *et al.*, 2009; Querido *et al.*, 2001; Stracker *et al.*, 2002). Die Interaktion von Cullin-5 mit der SCF-ähnlichen Ad5 E3-Ubiquitinligase erfolgt über die Interaktion des C-terminen Bereiches von Cullin-5 mit Rbx1, welches anschließend ein Ubiquitin übertragenden Enzym (E2) an den Komplex rekrutiert, um die Ubiquitylierung der Substrate zu ermöglichen (Querido *et al.*, 2001).

Um den Mechanismus der Daxx-Reduktion näher zu untersuchen, wurden Zellen verwendet, bei denen durch RNAi-Techniken die Cullin-5-Expression herunterreguliert wurde (H1299 Cullin-5 negativ). Nachdem die Zelllinien auf entsprechende Cullin-5-Expression überprüft wurden, wurden sie mit Ad5-Wildtypvirus H5pg4100 sowie den Virusmutanten H5pm4149 und H5pm4154 infiziert. Zum Nachweis der eingesetzten Proteinmengen für die Koimmunpräzipitation wurden Gesamtzell-extrakte hergestellt und *Western Blot* Analysen durchgeführt (Abb. 32).

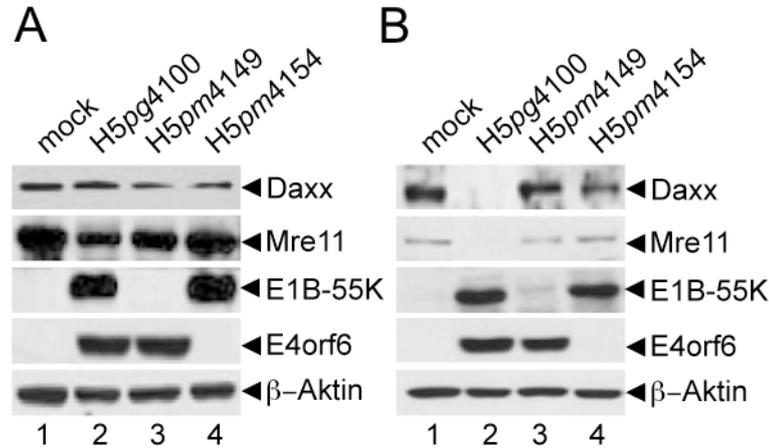


Abb. 32 Reduktion von Daxx in Abhängigkeit der Anwesenheit des zellulären E3-Ubiquitinligasefaktors Cullin-5 in infizierten H1299-Zellen

H1299-Zellen ohne (A) und mit (B) Cullin-5 wurden mit H5pg4100, sowie den Virusmutanten H5pm4149 und H5pm4154 (moi 50) infiziert und nach 20 h p.i. geerntet. Mock bedeutet nicht-infiziert. Zur Überprüfung der Expression wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (50 μ g bei Mre11, E1B-55K, E4orf6 und 100 μ g bei Daxx) auf 12%igen (Mre11, E1B-55K und E4orf6) und 10%igen (Daxx) SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert (4.6.4). Der Nachweis erfolgte mit den entsprechenden Antikörpern.

Die Untersuchungen zeigten wie erwartet, dass Daxx in H5pg4100-, und H5pm4154-infizierten Cullin-5 positiven H1299-Zellen reduziert wird (Abb. 32B). Interessanterweise kann diese Reduktion bei Abwesenheit von Cullin-5 (Abb. 32A) vermutlich durch Hemmung der Ubiquitylierung von Daxx durch Blockieren der Rbx1-Interaktion sowie Rekrutierung von E2-Komponenten verhindert werden. Wie erwartet, wird Mre11 als bereits beschriebenes zelluläres Ad5 E3-Ubiquitinligase Substrat (Stracker *et al.*, 2002) ebenfalls nur in Anwesenheit von Cullin-5 in Wildtyp-infizierten Zellen degradiert (Abb. 32B, Spur 2).

Dies ist ein wichtiger Hinweis auf Cullin-5 als zentrale zelluläre Komponente der unbekanntes Ad5 E3-Ligase, welche bei der E1B-55K- und Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Degradation von Daxx eine Rolle spielt. Dazu wurde überprüft, ob der Daxx Abbau von der posttranslationalen Modifikation und intrazellulären Lokalisation des E1B-55K-Proteins beeinflusst wird.

5.3.6 Die SUMO-Modifikation des E1B-55K-Proteins ist essenziell für den Abbau von Daxx

Neuere Untersuchungen zeigten, dass das E1B-55K-Protein durch kovalente Bindung mit SUMO-1 modifiziert werden kann (Endter *et al.*, 2001; Kindsmüller *et al.*, 2006). SUMO-1 gehört zur Familie der Ubiquitin-ähnlichen Proteine, die an eine Vielzahl zellulärer aber auch viraler Substratproteine angeheftet werden. Dies bewirkt hauptsächlich eine veränderte Affinität zu anderen Proteinen, was in vielen Fällen eine Änderung der Lokalisation und/oder der Aktivität zur Folge hat (Melchior, 2000b; Müller *et al.*, 2001; Pichler *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2001). Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten außerdem, dass sowohl die SCS und das NES von E1B-55K (Abb. 5) an zahlreichen Funktionen von E1B-55K beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, dass AS-Austausche in diesen Motiven die posttranskriptionellen, hauptsächlich transformationsrelevanten Eigenschaften von E1B-55K beeinflussen (Kindsmüller *et al.*, 2006).

Da in dieser Arbeit E1B-55K bereits mit dem Abbau von Daxx im Verlauf der Ad5 Infektion in Verbindung gebracht werden konnte, stellt sich die Frage, ob die SUMO-Modifikation des viralen Proteins Einfluss auf diesen Mechanismus hat. In den folgenden Analysen wurde deshalb getestet, ob E1B-55K-Virusmutanten mit eingeführten AS-Austauschen in den zuvor beschriebenen Sequenzmotiven den E1B-55K-, Ubiquitin- und Cullin-5-abhängigen, proteasomalen Abbau von Daxx unterstützen. Dazu wurden A549-Zellen infiziert, 24 h p.i. geerntet, Gesamtzell-extrakte hergestellt und *Western Blot* Analysen durchgeführt. Es ist bereits bekannt, dass E1B-55K in H5pg4100-, H5pm4101- und Hpm4154-infizierten A549-Zellen zunehmend stark SUMO-modifiziert wird (Kindsmüller *et al.*, 2006). Bei der Untersuchung der Daxx-Gleichgewichtsmengen konnte festgestellt werden, dass eine Reduktion des zellulären Faktors nur bei Anwesenheit von SUMOyliertem E1B-55K nachgewiesen werden konnte (Abb. 33, oben, Spur 2, 4, 6). Konsistent zur gesteigerten Proteinkonzentration der SUMOylierten E1B-Formen verstärkt sich auch die Reduktion von Daxx. Interessanterweise konnte in H5pm4149- und in H5pm4102-infizierten Zellen ohne E1B-55K-Expression oder mit defekter SUMO-Konjugationsstelle im E1B-55K-Protein kein Daxx-Abbau beobachtet werden (Abb. 32, Spuren 3 und 5).

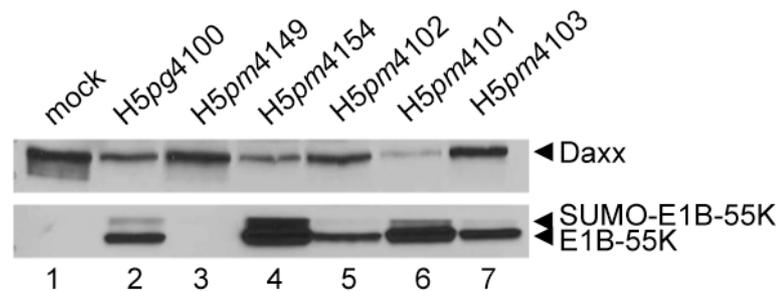


Abb. 33 SUMO-E1B-abhängige Daxx-Reduktion in infizierten A549-Zellen

A549-Zellen wurden mit H5pg4100, sowie den Virusmutanten H5pm4149, H5pm4154, H5pm4101, H5pm4102 und H5pm4103 infiziert (moi 50) und nach 24 h p.i. geerntet. Mock bedeutet nicht-infiziert. Es wurden je 100 µg (Daxx) und 50 µg (E1B-55K) Gesamtzellextrakt über 10%ige (Daxx) und 12%ige (E1B-55K) SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt und mittels *Western Blot* auf Nitrozellulose transferiert. Der Nachweis erfolgte mit dem Maus-Antikörper gegen E1B-55K (2A6) und dem Kaninchen-Antikörper gegen Daxx.

Diese Ergebnisse zeigen einen sehr engen Zusammenhang zwischen der SUMO-Modifikation des E1B-55K-Proteins und dem proteasomalen Abbau von Daxx. Vermutlich ist die SUMOylierung von E1B-55K nötig, um die Daxx-Ubiquitylierung einzuleiten.

5.3.7 Daxx wird nicht in zelluläre Aggresomen sequestriert

Es wurde bereits gezeigt, dass das zelluläre Substrat Mre11 neben dem klassischen Abbauweg durch die Ad5 E3-Ubiquitinligase über einen weiteren Mechanismus abgebaut werden kann. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass Ad5 die Inaktivierung des MRN-Komplexes auch unabhängig von E4orf6 unterstützt. Dieser Abbauweg konnte interessanterweise mit der Beteiligung zellulärer Aggresomen in Verbindung gebracht werden. Dies sind zytoplasmatische, perinukleäre Strukturen an den MTOC (Liu *et al.*, 2005). In diesen Bereichen der Zelle kann man unspezifischen proteasomalen Abbau aggregierter Protein beobachten. Es konnte gezeigt werden, dass durch E1B-55K, p53 und Mre11 in transformierten Zellen in solche Aggresomen-ähnliche Strukturen sequestriert werden (Härtl *et al.*, 2008). Während der viralen Infektion interagiert E4orf3 mit Mre11 an den PML-NBs, bevor die Interaktion mit E1B-55K und anschließende Umlokalisierung in die perinukleären Strukturen, beobachtet werden kann. Frühere Untersuchungen zeigten, dass neben E1B-55K entweder E4orf3 oder E4orf6 essenziell ist, um Mre11 sowie dessen proteasomalen Abbau in den zellulären E1B-abhängigen Aggresome zu unterstützen (Araujo *et al.*, 2005). Da Daxx wie Mre11 ein zellulärer Interaktionsfaktor des viralen E1B-55K-Protein ist, in PML-NBs lokalisiert und beide Proteine über proteasomale Abbauwege degradiert werden, liegt es nahe, dass auch Daxx in die Aggresomen umlokalisiert wird, um dort abgebaut zu werden.

Eine erste Möglichkeit diese Arbeitsthese zu bestätigen ist die Untersuchung der Interaktion von Daxx mit dem viralen E4orf3 Protein (Abb. 34). Dazu wurden H1299-Zellen mit Ad5-Wildtypvirus H5pg4100, H5pm4149, H5pm4154, H5pm4150 und H5pm4155 infiziert und *Western Blot* Analysen zur Ermittlung der Gleichgewichtsmengen der untersuchten Protein durchgeführt (Abb. 34A). Gleiche Mengen an

Protein wurden dann mit dem Daxx-Antikörper immunpräzipitiert und dann mit den spezifischen Antikörpern gegen E1B-55K und E4orf3 detektiert (Abb. 34B). Die Ergebnisse gehen einher mit der bereits postulierten Bindung zwischen endogenem Daxx und E1B-55K in Zelllysaten in denen das virale Proteine anwesend ist (Abb. 34B, Spuren 2, 4, 5, 6). Weiterhin konnte eine Interaktion von Daxx mit E4orf3 ausgeschlossen werden, da trotz ausreichender E4orf3-Expression (Abb. 34A, Spuren 2, 3, 4) keine Immunpräzipitation durch Daxx möglich war (Abb. 34B). Diese Ergebnisse geben bereits erste Hinweise darauf, dass Daxx nicht durch E1B-55K und mit Beteiligung von E4orf3 in die zellulären Aggresomen sequestriert wird. Um diese Annahme zu bestätigen, wurden zusätzlich Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt, um eine Lokalisation von Daxx in perinukleären Strukturen mit E1B-55K und E4orf3 ausschließen zu können. Dazu wurden H1299-Zellen analog der Immunpräzipitationsanalyse (Abb. 34AB) mit Ad5 Wildtyp sowie den Virusmutanten infiziert und 20 h p.i. fixiert. Daxx, E1B-55K und E4orf3 wurden mit spezifischen Antikörpern immundetektiert und mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern sichtbar gemacht. Die Untersuchung zeigt die Lokalisation von E1B-55K in den bereits beschriebenen Verteilungsmustern, diffus und in perinukleären Strukturen in den Wildtyp-infizierten Zellen (Abb. 34Cd, Ce, Cf). Daxx ist hauptsächlich im Zellkern detektierbar. Konsistent zu den *Western Blot* Daten, konnte im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen (mock) weniger Daxx detektiert werden, wenn E1B-55K anwesend ist (Abb. 34C; H5pg4100, H5pm4149, H5pm4154). Im Ganzen lässt die Immunfärbung von Daxx und E1B-55K eine Kolokalisation beider Proteine klar erkennen (Abb. 34Cf, Cl, Co). Es kann weiterhin gezeigt werden, dass Daxx nicht in E1B-abhängigen Aggresomen-ähnlichen Strukturen nahe dem Zellkerns lokalisiert (Abb. 34Cd, Cl, Cm). In weiteren Analysen wurde die E4orf3 Lokalisation in infizierten Zellen untersucht (Abb. 34D). Dabei konnten in Wildtyp-infizierten Zellen 20 h p.i. bereits längliche nukleäre Aggregate detektiert werden (Abb. 34De). Frühere Arbeiten zeigten bereits, dass E4orf3 in infizierten Zellen mit den PML-NB-Strukturen kolokalisiert und daraufhin deren Umverteilung induziert (Carvalho *et al.*, 1995a; Doucas *et al.*, 1996b). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen konnten aber keine Kolokalisation von E4orf3 mit Daxx bestätigen (Abb. 34Df, Di) und schließen somit einen E1B-abhängigen,

proteasomalen, Ubiquitin-abhängigen Abbau mit Beteiligung von zellulären Ad5-induzierten Aggresomen aus.

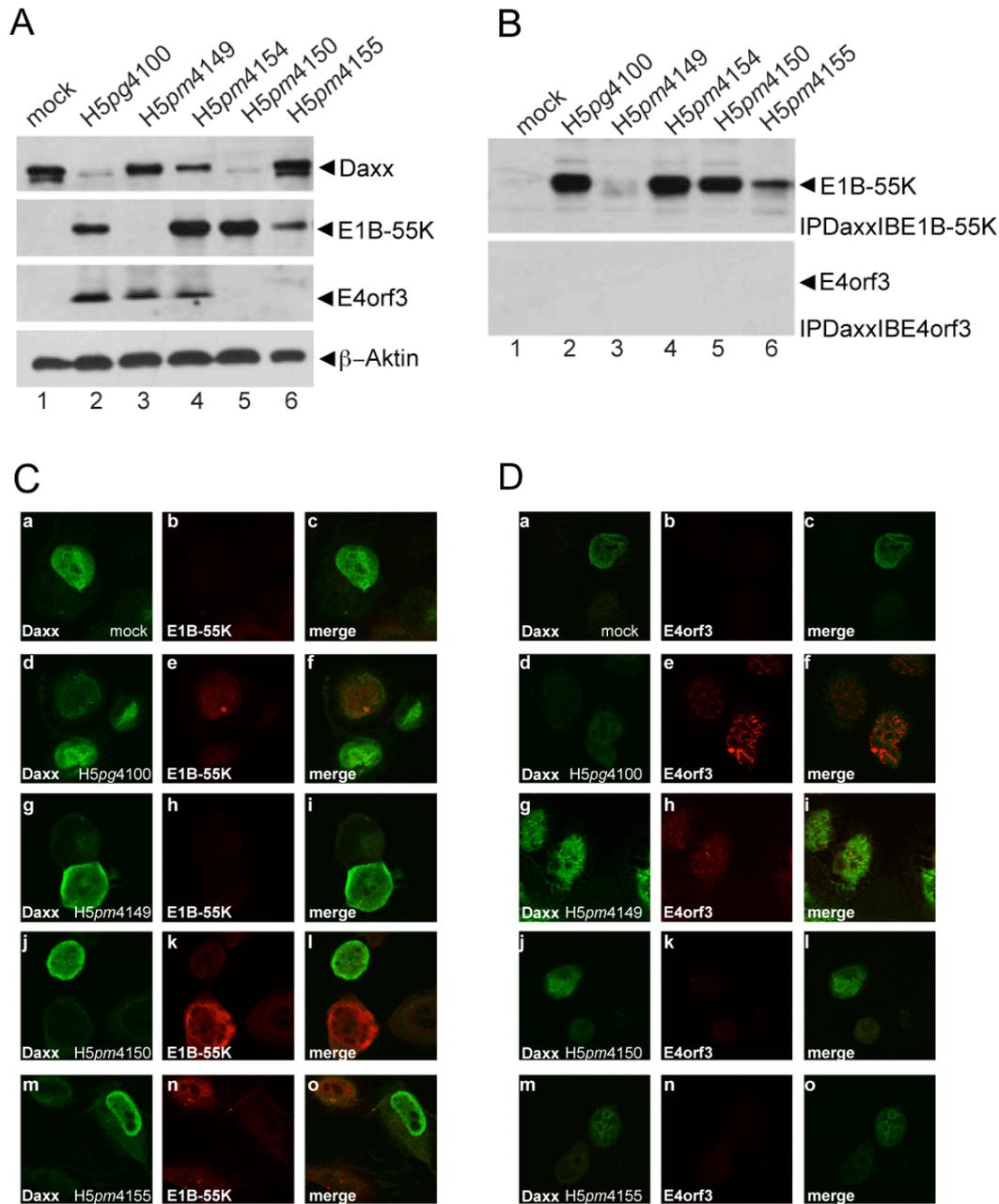


Abb. 34 Interaktion und Lokalisation von Daxx mit E4orf3 und E1B-55K in infizierten H1299-Zellen

H1299-Zellen wurden mit H5pg4100, sowie den Virusmutanten H5pm4149, H5pm4154, H5pm4150, und H5pm4155 infiziert (moi 50; 4.3.4), 20 h p.i. geerntet (4.2.5) und wie unter 4.5.2 beschrieben lysiert (A und B) oder 20 h p.i. methanolfixiert (C und D). A. Zur Überprüfung der Expression wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (100 µg für Daxx, 50 µg für E1B-55K, E4orf3 und β-Aktin) mittels 15%iger (E4orf3), 12%iger (E1B-55K, β-Aktin) oder 10%iger (Daxx) SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt, durch *Western Blot* auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen Daxx, E1B-55K (2A6), E4orf3 (6A11) oder β-Aktin (AC-15) als Ladekontrolle inkubiert (4.6.4). B. Zur Koimmunpräzipitation

der E1B-55K und E4orf3 Proteine verschiedener Virusmutanten mit Daxx wurde das Zelllysate vor dem *Western Blot* mit dem Daxx-Antikörper immunpräzipitiert (4.6.5) und dann über 15%ige (E4orf3) oder 12%ige (E1B-55K) SDS-Gele aufgetrennt. Anschließend auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen E4orf3 (6A11) sowie E1B-55K (2A6) inkubiert. C und D. Die Proteine wurden mit dem α -Daxx-Antikörper aus Kaninchen, dem α -E1B-55K Maus-Antikörper 2A6 (C) und mit dem α -E4orf3 Ratten-Antikörper 6A11 (D) immundetektiert, welche wiederum mit einem α -Maus- (C) oder α -Ratte- (D) Texasrot gekoppelten oder α -Kaninchen-FITC-gekoppelten Sekundärantikörpern (Daxx) detektiert wurden. Merge zeigt die Überlagerungen der entsprechenden Immunfluoreszenzfärbungen.

5.4 Herstellung der Ad5 Virusmutanten H5pm4197 und H5pm4198 mit Mutationen im Daxx-Bindemotiv von E1B-55K

Bisher wurden die Eigenschaften der E1B-55K/Daxx-Bindemutanten nur durch Transfektionsanalysen untersucht. Mit diesen Methoden können zwar die Auswirkungen der Mutation sehr gut abgeschätzt werden, jedoch keine genaueren Aussagen über die Effekte in Ad5-infizierten Zellen gemacht werden. Um die Daten dieser Arbeit im viralen Kontext zu bestätigen, wurden zunächst Adenoviren generiert, die definierte AS-Austausche in der Daxx-Interaktionssequenz von E1B-55K tragen (Abb. 35).

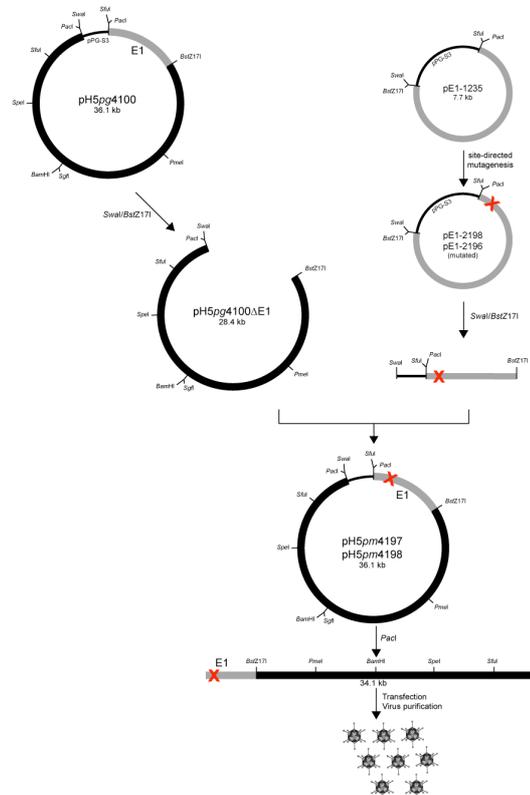


Abb. 35 Klonierungsschema zur Herstellung der E1B-55K Virusmutanten

In die E1-Region (grau; pE1-1235) konnten mit Hilfe des *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits* (Stratagene) Mutationen an E1B-55K AS-Positionen 185/187 (H5pm4198) oder 472 (H5pm4197) eingefügt werden (rotes X). Anschließend wurden die mutierten Plasmide über *SwaI/BstZ17I* in das Ad5 Bacmid (pH5pg4100) rückkloniert. Das daraus resultierende Plasmid wurde nach der Nummer in der Datenbank der Arbeitsgruppe als H5pm4198 und H5pm4197 bezeichnet. Die Plasmide wurden danach mit *PacI* linearisiert, der bakterielle Anteil entfernt und in die Helferzelllinie 2E2 transfiziert. Aus den Zellen konnten dann infektiöse Viruspartikel isoliert werden (4.3.2 und 4.3.3).

Dies erfolgte mit einem in unserer Arbeitsgruppe etablierten direkten Klonierungssystem zur zielgerichteten Veränderung der E1-Region (Abb. 35; Groitl *et al.*, 2007). Dazu wurden zunächst die Mutationen KK185/187AA und E472A mit Hilfe des *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits* (Stratagene) in die E1B-Sequenz der E1-Box (pE1-1235) eingeführt. Als nächstes erfolgte die Rückklonierung der modifizierten E1-Box in das 36 kb große Ad5-Genom. Im Anschluss wurde dieses Bacmid mit *PacI* linearisiert und somit der bakterielle und der virale Anteil getrennt. Nun konnte die doppelsträngige Virus-DNA in die Ad5 E1-, und E4-transformierte Helferzelllinie 2E2 transfiziert werden. Anschließend konnten die Virusmutanten H5pm4197 und H5pm4198 wie unter 4.3.2 und 4.3.3 beschrieben, geerntet und propagiert werden.

5.4.1 Mutationen im Daxx-Bindemotiv von E1B-55K beeinflussen die subzelluläre Lokalisation

Um zu überprüfen, ob die eingeführten Mutationen einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation des E1B-Proteins haben wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt (Abb. 36). Dazu wurden A549-Zellen infiziert und mit spezifischen Antikörpern gegen E1B-55K (Abb. 36A) sowie Daxx (Abb. 36B) behandelt. Konsistent mit bisherigen Arbeiten zeigten die Analysen, dass E1B-55K in Wildtypvirus-infizierten Zellen ein komplexes Muster sowohl nukleärer als auch zytoplasmatischer Lokalisation zeigt (Grand *et al.*, 1984; Smiley *et al.*, 1990). Im Zellkern ist das virale Polypeptid wie erwartet diffus verteilt, wobei die Bereiche der Nukleoli ausgeschlossen waren. Darüber hinaus lokalisierte E1B-55K punktförmig an spezifischen nukleären Strukturen, die wahrscheinlich die viralen Transkriptions- und Replikationszentren darstellen (Abb. 36Ae, Af; Ornelles *et al.*, 1991).

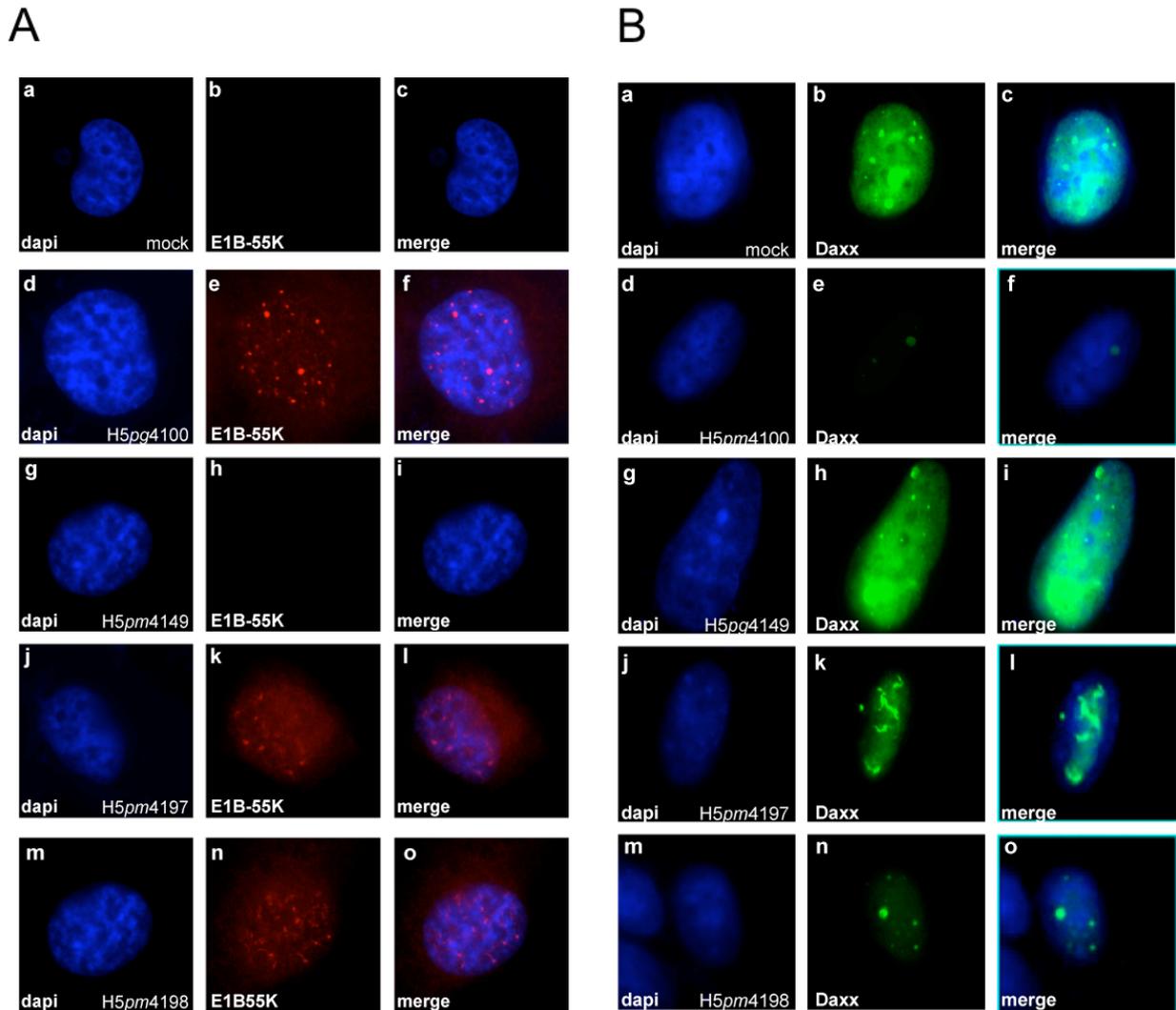


Abb. 36 Expression und Lokalisation von E1B-55K und Daxx in infizierten A549- Zellen

A549-Zellen wurden mit H5pg4100, sowie den Virusmutanten H5pm4149, H5pm4197 und H5pm4198 infiziert (moi 50; 4.3.4) A. 20 h p.i. wurden die Zellen fixiert. E1B-55K wurde mit dem α -E1B-Ratten-Antikörper 4E8 immunodetektiert. Dieser wurde wiederum mit einem α -Ratte-Texasrot-gekoppelten-Sekundärantikörper detektiert. B. 36 h p.i. wurde die Zellen fixiert. Daxx wurde mit einem α -Daxx Kaninchen-Antikörper immungefärbt und mit einem α -Kaninchen-FITC-gekoppelten-Sekundärantikörper detektiert. Merge zeigt die Überlagerungen der entsprechenden Immunfluoreszenzen und dapi markiert den Zellkern.

Die Ergebnisse zeigen, dass im Gegensatz zum Wildtyp E1B-55K, beide veränderten viralen Proteine (H5pm4197, H5pm4198) eine stärker diffuse Verteilung des viralen Proteins im Zellkern aufweisen. Es konnte beobachtet werden, dass in den meisten Zellen (>90%) zwar punktförmige nukleäre Strukturen detektiert werden konnten, jedoch waren diese im Vergleich zu H5pg4100 kleiner und zeigten fibrilläre Formen (Abb. 36Ak, An). Im Vergleich zur beschriebenen E1B-55K Lokalisation konnte bei

beiden Mutanten (H5pm4197, H5pm4198) nur diffuses E1B in nukleären und zytoplasmatischen Bereichen nachgewiesen werden (Abb. 36Ak, Al, An, Ao). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Aggregationen in punktförmigen Strukturen im Nukleus durch die eingeführte Punktmutation im Daxx-Interaktionsmotiv von E1B-55K, nicht mehr beobachtet werden konnten. Weiterhin zeigten die Immunfluoreszenzanalysen konsistent mit den bereits durchgeführten Untersuchungen sehr geringe Mengen des zellulären Proteins Daxx in H5pg4100-infizierten Zellen (Abb. 36Bh, Bi) verglichen mit nicht-infizierten (Abb. 36Bb, Bc) sowie H5pm4149-infizierten Zellen (Abb. 36Be, Bf). Dagegen konnte keine Reduktion der Daxx-Gleichgewichtsmengen in H5pm4197- und H5pm4198- behandelten Zellen beobachtet werden (Abb. 36Bk, Bn, Bl, Bo).

5.4.2 Mutationen im Daxx-Bindemotiv von E1B-55K haben keinen Einfluss auf die effiziente Ad5-Replikation

Zunächst wurden die generierten Virusmutanten auf die Effizienz der Nachkommenproduktion getestet. Für diese Untersuchung wurden A549-Zellen mit Ad5-Wildtypvirus, H5pm4149, H5pm4197 sowie H5pm4198 infiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Durch Titrationsverfahren konnten die infektiösen Viruspartikel ermittelt werden. Interessanterweise zeigen H5pm4197 und H5pm4198 verglichen mit Ad5 Wildtyp keine starken Unterschiede in der Anzahl neu produzierter Viren nach unterschiedlichen Zeitpunkten (Abb. 37A). Es ist nicht überraschend, dass H5pm4149 bei der Nachkommenproduktion einen starken Defekt zeigt, da E1B-55K zur Synthese neuer Viren essenziell ist (Abb. 37A). Diese Daten lassen darauf schließen, dass die eingeführten Mutationen im Daxx-Bindemotiv von E1B-55K keinen Einfluss auf die Nachkommenvirusproduktion in A549-Zellen zeigen.

Im Folgenden wurde außerdem überprüft, ob die eingeführte Mutation im E1B-55K einen Einfluss auf die Initiation der viralen DNA-Replikation hat. Dazu wurden A549-Zellen mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert, nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und aufgeschlossen. Zur Ermittlung der DNA-Mengen wurde eine semi-quantitative PCR-Reaktion wie unter 4.4.5.3 beschrieben durchgeführt. Die

Reaktionsprodukte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert und mit Hilfe des Computerprogramms *Gene tools* des G-Box-Systems (Syngene) densitometrisch quantifiziert (Abb 37B). Die Ergebnisse der PCR zeigten keine signifikanten Unterschiede der relativen Intensität der DNA-Banden bei den entsprechenden Zeitpunkten (Abb. 37B). Es kann also angenommen werden, dass die Mutationen im Daxx-Bindemotiv von E1B-55K keinen Einfluss auf die Effizienz der viralen DNA-Replikation haben.

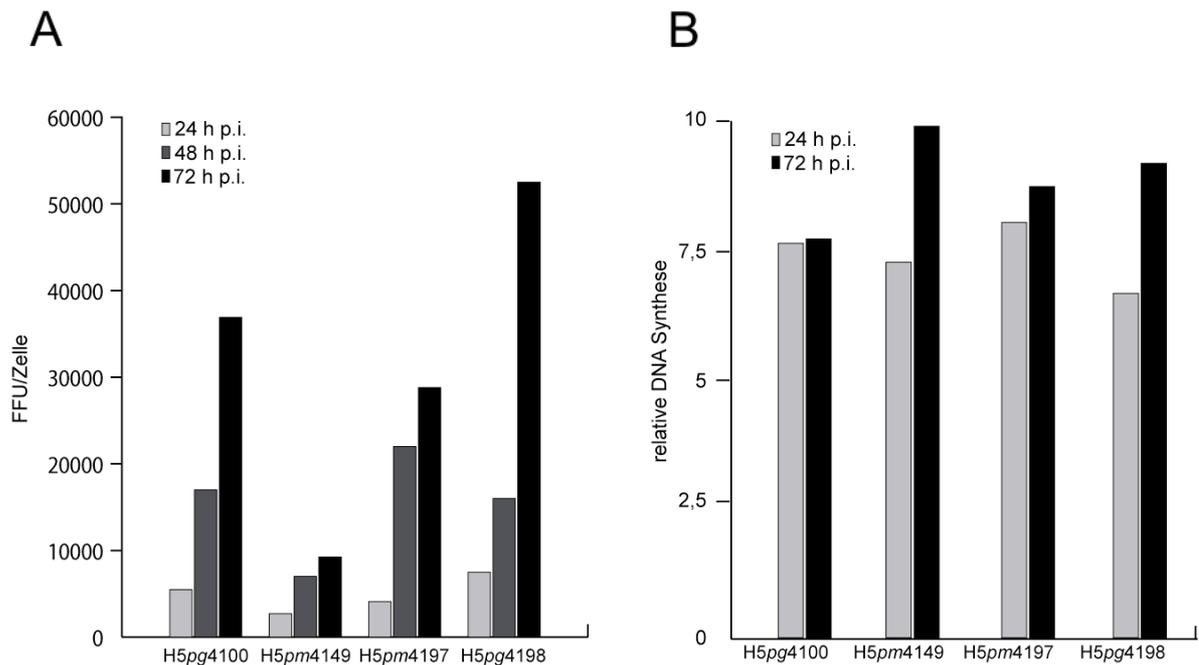
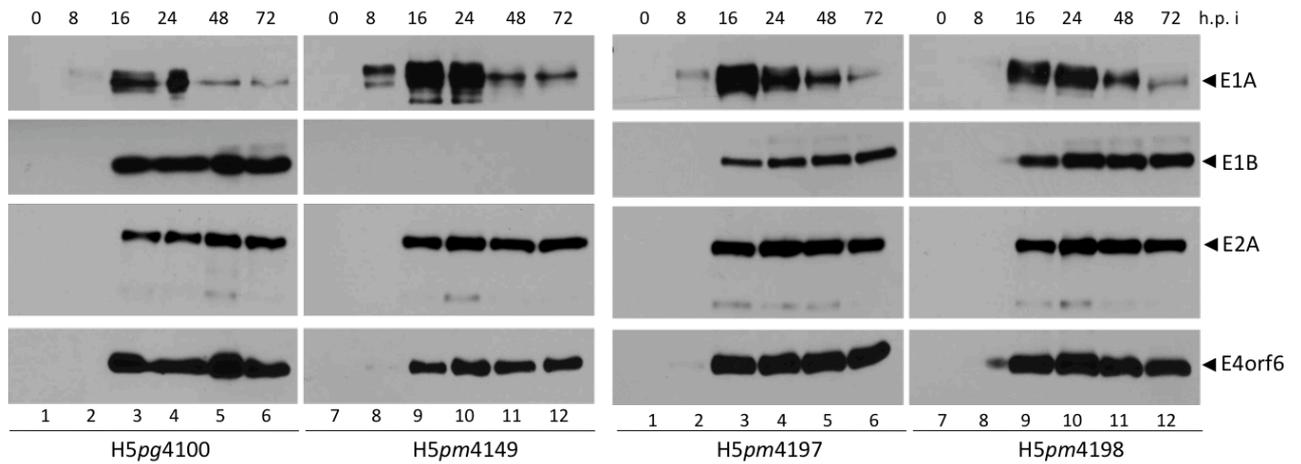


Abb. 37 Analyse der viralen Nachkommenproduktion und der viralen DNA-Synthese in infizierten H1299-Zellen

A. Zur Bestimmung der Ausbeute an Nachkommenviren wurden H1299-Zellen mit H5pg4100, H5pm4149, H5pm4197 und H5pm4198 (moi 50) infiziert. Die Zellen wurden 24, 48 und 72 h p.i. geerntet und Nachkommenviren isoliert (4.3.5). Anschließend erfolgte eine Titration auf 293-Zellen (4.3.3) um die Ausbeute an neusynthetisierten Partikeln zu ermitteln. B. Die H1299-Zellen wurden mit H5pg4100, H5pm4149, H5pm4197 und H5pm4198 (moi 50) infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Mock bedeutet nicht-infiziert. Durch geeignete Oligonukleotide (#64 und #110) konnte ein 389 bp langes PCR-Produkt aus dem Ad5 E1B-Gen amplifiziert und auf einem Agarosegel sichtbar gemacht werden. Durch densitometrische Analyse mit dem Computerprogramm *Gene tools* (Syngene) konnte die relative DNA-Synthese bestimmt und graphisch dargestellt werden (4.4.5.3).

Dieses Ergebnis ist konsistent mit früheren Untersuchungen, bei denen ebenfalls kein Unterschied in der Replikation der viralen DNA zwischen Ad5 Wildtyp und E1B-deletierten Viren festgestellt werden konnte (Goodrum *et al.*, 1997; Goodrum *et al.*, 1998; Leppard *et al.*, 1989; Pilder *et al.*, 1986a; Williams *et al.*, 1986).

A



B

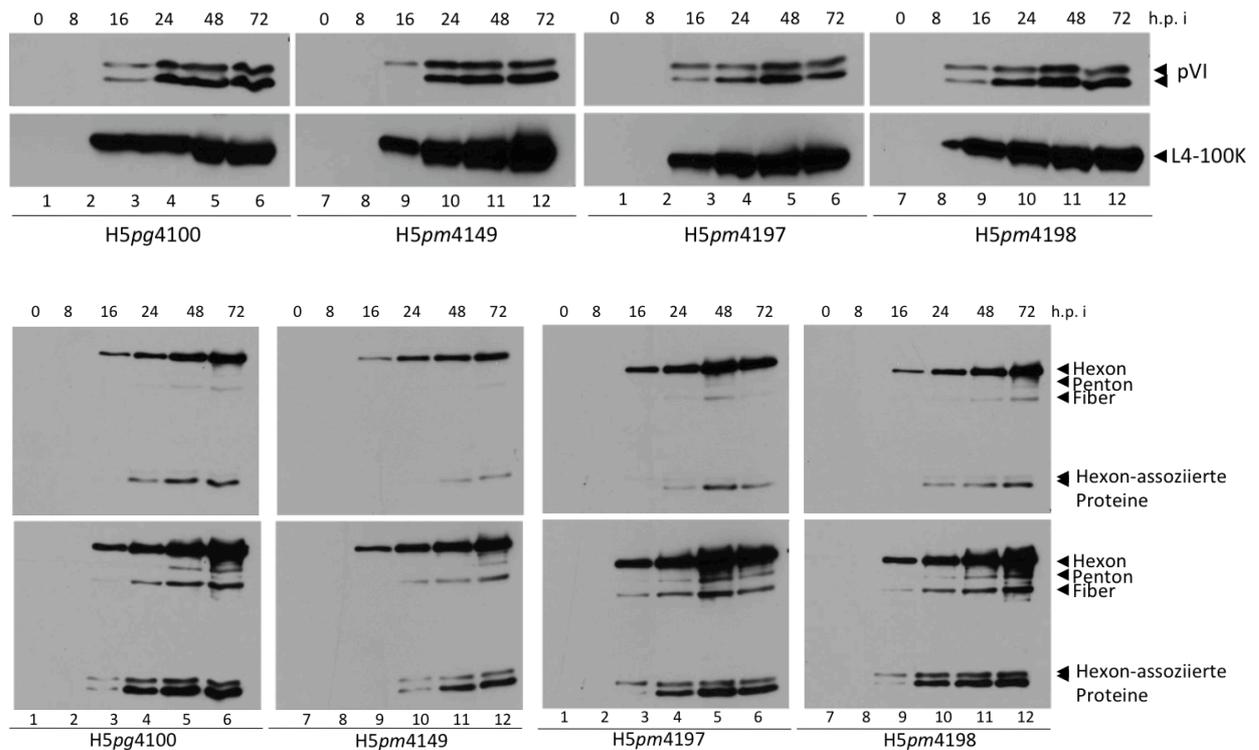


Abb. 38 Analyse zur Produktion früher und später viraler Proteine in infizierten A549-Zellen

A549-Zellen wurden mit H5pg4100 sowie den E1B-Virusmutanten H5pm4149, H5pm4197 sowie H5pm4198 (moi 50) infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht-infiziert (mock). Zur Überprüfung der Proteinexpression wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (5 µg bei E2A, Hexon, Penton, Fiber und Hexon-assoziierten Proteine; 50 µg bei E1A, E1B-55K, E4orf6, pVI und L4-100K) Gesamtzellextrakt auf 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert (4.6.4). A. Der Nachweis früher viraler Protein erfolgte mit dem α-E1A (M73), dem α-E2A (B6-10), α-E1B (2A6), α-E4orf6 (RSA3) Maus-Antikörper. B. Der Nachweis später viraler Protein erfolgte mit dem α-L4-100K Ratten-Antikörper (6B-10), dem α-pVI Kaninchen-Antikörper und dem α-late Kaninchen-Serum, das für mehrere virale Strukturproteine spezifisch ist.

Zur weiteren Charakterisierung der Virusmutanten wurde im nächsten Schritt das Expressionsmuster früher (Abb. 38A) und später viraler Proteine ermittelt (Abb. 38B). A549-Zellen wurden mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert, nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und Gesamtzellextrakt hergestellt. Mittels SDS-Gelelektrophorese konnten die jeweiligen viralen Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt und über *Western Blot* analysiert werden. Die Expressionsmuster der frühen viralen Proteine E1A, E1B-55K, E2A und E4orf6 weisen in H5pm4197- und H5pm4198-infizierten Zellen keine signifikanten Unterschiede verglichen zur Wildtypvirus-Infektion (Abb. 38A) auf. Konsistent mit den Ergebnissen der Nachkommenvirenproduktion und der viralen DNA-Synthese konnten auch bei den Proteinmengen des späten viralen Proteins L4-100K und der Strukturproteine pVI, Hexon, Penton, Fiber und Hexon-assoziierten Proteinen keine Defekte seitens der E1B-Virusmutanten beobachtet werden (Abb. 38B).

Insgesamt konnte mit diesen Analysen gezeigt werden, dass sowohl die Synthese früher und später viraler Strukturproteine, die Synthese viraler DNA als auch die Produktion von Nachkommenviren nicht vom Vorhandensein eines funktionellen Daxx-Interaktionsmotivs im E1B-55K abhängig sind. Somit haben diese Mutationen vermutlich keinen Einfluss auf den viralen Replikationszyklus in A549-Zellen.

Um nun zu testen, ob die veränderten E1B-Proteine noch in der Lage sind mit E4orf6 den proteasomalen Abbau von p53 zu vermitteln, wurde der Tumorsuppressor mittels *Western Blot* Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion untersucht (Abb. 39). In A549-Zellen, die mit der E1B-negativen Mutante H5pm4149 infiziert wurden, kommt es wie erwartet zu einer starken Akkumulation von p53, welches nicht dem Abbau zugeführt werden kann (Abb. 39, Spuren 7-12). In Wildtypvirus-infizierten Zellen hingegen ist das p53-Protein bereits 16 h p.i. nicht mehr nachweisbar (Abb. 39, Spuren 1-6). Ein etwas verzögerter Abbau kann bei beiden Virusmutanten H5pm4197 (Abb. 39, Spuren 1-6) und H5pm4198 (Abb. 39, Spuren 7-12) beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte deutlich nachgewiesen werden, dass die Daxx Expressionsmengen in Wildtyp-infizierten Zellen deutlich reduziert werden (Abb. 39,

Spuren 1-6), wohingegen diese Beobachtung interessanterweise nicht bei den Virusmutanten mit defekter Daxx-Bindestelle im E1B-55K-Protein gemacht werden konnte (Abb. 39, *Hpm4197*, *Hpm4198*, Spuren 1-12).

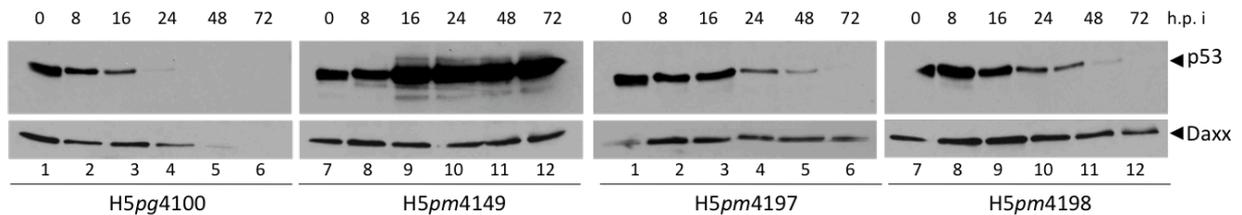


Abb. 39 Abbau von p53 und von Daxx in infizierten A549-Zellen

A549-Zellen wurden mit *H5pg4100*, *H5pm4149*, *H5pm4197* und *H5pm4198* (moi 50) infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet. Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht-infiziert (mock). Zur Überprüfung der Expression wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (50 µg bei p53 und 100 µg bei Daxx) auf 12%igen (p53) und 10%igen (Daxx) SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert (4.6.4). Der Nachweis erfolgte mit dem α -p53 Maus (DO-1) und dem α -Daxx Kaninchen-Antikörper.

Dies lässt vermuten, dass die Daxx-Interaktionsdomäne im E1B-Leserahmen essenziell für die Reduktion der Daxx-Gleichgewichtsmengen in der späten adenoviralen Infektionsphase ist. Weiterhin unterstützt dieser Befund die Annahme, dass die Abwesenheit eines der beiden Daxx-Bindemotive von E1B-55K vollständig ausreichend ist, um den Abbau des zellulären Faktors zu verhindern.

5.4.3 Interaktion von E1B-55K mit Daxx in *H5pm4197*- und *H5pm4198*-infizierten Zellen

Um die Interaktion zwischen Daxx und E1B-55K in virusinfizierten Zellen zu überprüfen, wurden kombinierte Koimmunpräzipitations-/Western Blot Analysen mit Gesamtzellextrakt aus *H5pg4100*-, *H5pm4149*-, *H5pm4197*- und *H5pm4198*-infizierten A549-Zellen durchgeführt (Abb. 40).

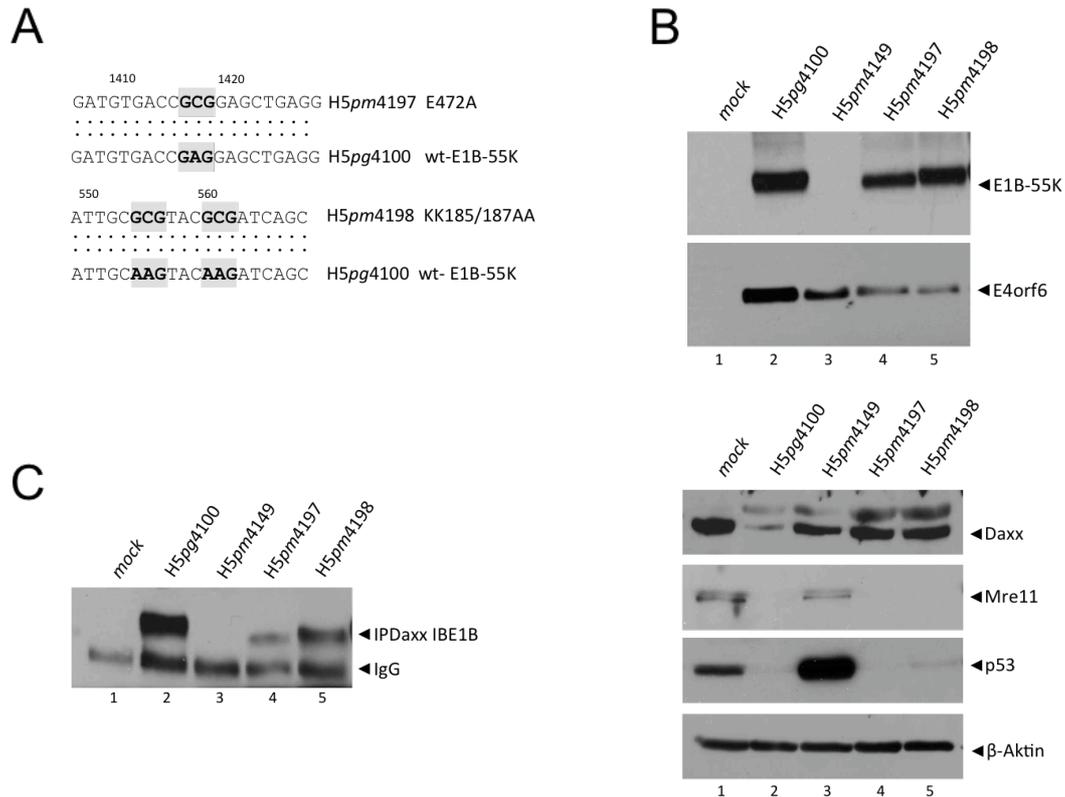


Abb. 40 Übersicht der untersuchten E1B-Virusmutanten sowie E1B-55K/Daxx-Bindung in infizierten A549-Zellen

A. Übersicht der verwendeten Ad5 Virusmutanten. Die Basenaustausche in den Motiven verglichen zur Wildtypsequenz sind jeweils mit grauen Balken hinterlegt und entsprechend ihrer Lage im E1B-55K-Protein dargestellt (dunkelgrau). Nummern kennzeichnen jeweils die Position der Basen in den Motiven von E1B-55K. B. A549-Zellen wurden mit H5pg4100, H5pm4149, H5pm4197 sowie H5pm4198 (moi 50) infiziert (4.3.4), 24 h p.i. geerntet (4.2.5) und wie unter 4.5.2 beschrieben, lysiert. Zur Überprüfung der Expression der viralen Proteine (A.) sowie der zellulären Proteine (B.) wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (100 µg für Daxx, 50 µg für Mre11, p53, β-Aktin, E1B-55K und E4orf6) mittels 12%iger (Mre11, p53, β-Aktin, E1B-55K und E4orf6) oder 10%iger (Daxx) SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit entsprechenden Antikörpern inkubiert (4.6.4). C. Zur Koimmunpräzipitation der verschiedenen Virusmutanten mit Daxx wurde 1 mg Zelllysate vor dem *Western Blot* mit dem Daxx-Antikörper immunpräzipitiert (4.6.5) und dann über 12%ige (E1B-55K) SDS-Gele aufgetrennt. Anschließend mittels *Western Blot* auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen E1B-55K (2A6) inkubiert.

Die *Western Blot* Analyse der Gleichgewichtsmengen zellulärer und viraler Proteine zeigt konsistent mit den Ergebnissen dieser Arbeit eine Reduktion der Daxx Proteinmenge in Wildtyp-infizierten Zellen (Abb. 40B, Spur 2). Weiterhin konnten Mre11 und p53 als zwei bekannte zelluläre Substrate des E1B-55K/E4orf6-Komplexes in H5pg4100, H5pm4197 und H5pm4198 behandelten Zellen abgebaut werden (Abb. 40, Spuren 2, 4 und 5). Folglich können die E1B-Proteine in H5pm4197- und

H5pm4198-infizierter Zellen trotz geringerer Gleichgewichtsmengen von E4orf6 (Abb. 40B, Spuren 4 und 5) eine funktionelle Ad5 E1B-55K/E4orf6-abhängige-E3-Ubiquitinligase ausbilden. Die Koimmunpräzipitationsanalysen zeigten jedoch überraschenderweise, dass beide mutierten E1B-Proteine sowie das Wildtyp-Protein an Daxx binden (Abb. 40C; Spuren 4 und 5). Trotz ähnlicher Gleichgewichtsmengen (Abb. 40B, Spuren 2, 4 und 5) ist die Menge des präzipitierten E1B-55K-Proteins bei beiden Virusmutanten (H5pm4197, H5pm4198; Abb. 40C, Spuren 4 und 5) geringer als in H5pg4100-infizierten Zellen (Abb. 40C, Spur 2).

Diese Ergebnisse sind nicht konsistent mit den Daten zur Untersuchung der punktmutierten E1B-55K Plasmide KK185/187AA und E472A (Abb. 9). Im Unterschied zu den Transfektionsanalysen wurden diese Koimmunpräzipitations-Analysen aber in infizierten Zellen in Anwesenheit weiterer viraler Faktoren durchgeführt (Abb. 40). Aufgrund dieser Beobachtungen wäre es denkbar, dass an der Interaktion von E1B-55K mit Daxx *in vivo* im Verlauf der Ad5 Infektion noch andere virale Komponenten beteiligt sein könnten, die in indirekten Koimmunpräzipitations-Analysen eine E1B-55K/Daxx-Bindung vermitteln trotz mutiertem Daxx-Interaktionsmotiv im E1B-55K-Protein. Um diesen Befund zu überprüfen, wurden frühe und späte virale Proteine hinsichtlich ihrer möglichen Interaktion mit Daxx getestet.

5.5 Identifizierung weiterer adenoviraler Interaktionspartner von Daxx im Verlauf des produktiven Ad5-Replikationszyklus

5.5.1 Analysen zur Interaktion von Daxx mit den frühen und späten Ad5-Proteinen

Um eine mögliche Interaktion der frühen viralen Proteine E1A (Abb. 41A), E2A (Abb. 41B), E4orf6 (Abb. 41D) sowie der später Proteine pVI (Abb. 41E), pVII (Abb. 41F) und L4-100K (Abb. 41G) mit Daxx zu überprüfen, wurden A549-Zellen mit H5pg4100, H5pm4149, H5pm4154, H5pm4150 sowie H5pm4166 infiziert und Koimmunpräzipitations- sowie *Western Blot* Analysen durchgeführt (Abb. 41). Die Ergebnisse

zeigten 20 h p.i. trotz ausreichender Expressionsmengen des viralen E1A Proteins (Abb. 41A) und Daxx (Abb. 41H) keine Interaktion mit dem zellulären Faktor (Abb. 41A). Es konnte kein E1A Signal nach Koimmunpräzipitation mit dem Daxx Antikörper detektiert werden. Interessanterweise konnte aber das virale E2A-Protein unabhängig von E1B-55K (H5pm4149, Abb. 41B, Spur 3) präzipitiert werden. Da eine Interaktion zwischen E1B-55K und E2A bisher nicht bekannt ist, wurde E2A nicht als Faktor zur Vermittlung der Interaktion zwischen Daxx und E1B-55K in der viralen Infektion in Betracht gezogen. Konsistent zu den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit konnte erneut die Daxx/E1B-55K-Interaktion in infizierten A549-Zellen bestätigt werden (Abb. 41C). Wie erwartet zeigt der virale Faktor E4orf6 keine Interaktion mit Daxx (Abb. 41D). Es konnte kein E4orf6-Signal nach Koimmunpräzipitation mit dem Daxx-Antikörper detektiert werden. Das virale L4-100K Protein zeigt in diesen Analysen ebenfalls eine Interaktion mit dem viralen Faktor Daxx. (Abb. 41G). Es kann beobachtet werden, dass auch vor einem E1B-55K-negativen Hintergrund (Abb. 41G, Spur 2) eine Bindung mit Daxx nachgewiesen werden kann. Das bedeutet, dass L4-100K unabhängig von E1B-55K mit Daxx einen Komplex ausbildet. Das virale Capsid-Protein pVI (Abb. 41E) sowie das Core-assoziierte Protein pVII (Abb. 41F) wurden in allen virusinfizierten Zellen zu vergleichbaren Mengen exprimiert. Frühere Arbeiten zeigten bereits, dass pVII in der frühen Phase der Infektion komplexiert mit dem adenoviralen Genom nachzuweisen ist (Wodrich *et al.*, 2006). Überraschenderweise konnte erstmals beobachtet werden, dass beide späten Proteine mit Daxx wechselwirken. Es fällt jedoch auf, dass trotz vergleichbarer Proteinkonzentrationen von pVII in H5pm4149- und H5pm5154-infizierten Zellen, eine sehr geringe Menge des viralen Proteins durch Daxx koimmunpräzipitiert wurde, verglichen zu Wildtypvirus-infizierten Zellen (Abb. 41E und F).

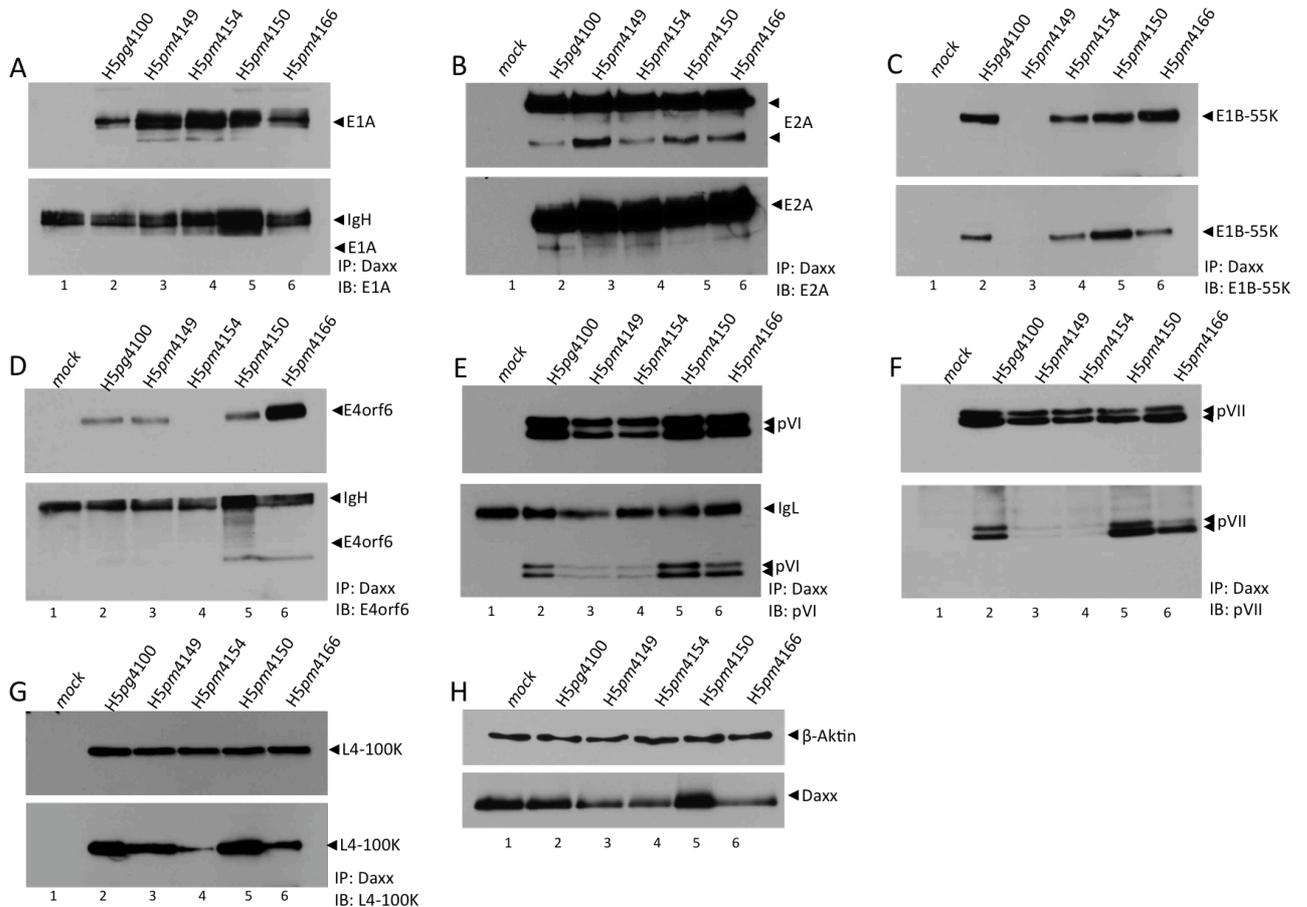


Abb. 41 Interaktion von Daxx mit viralen Proteinen in infizierten A549-Zellen

A549-Zellen wurden mit H5pg4100 sowie den Virusmutanten H5pm4149, H5pm4154, H5pm4150 und H5pm4166 infiziert (moi 50) (4.3.4), 20 h p.i. geerntet (4.2.5) und wie unter 4.5.2 beschrieben lysiert. Zur Überprüfung der eingesetzten Gleichgewichtsmengen wurden jeweils vom Gesamtzellextrakt 50 µg E1A(A.), E2A (B.), E1B-55K (C.), E4orf6 (D.), pVI (E.) und pVII (F.) sowie 100 µg für Daxx und β-Aktin (G.) auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Anschließend erfolgte der Transfer der Proteine auf Nitrozellulose, bevor sie mit entsprechenden Antikörpern inkubiert wurden (4.6.4). Zur Koimmunpräzipitation der viralen Proteine mit Daxx wurde das Zelllysate zuvor mit dem Daxx-Antikörper immunpräzipitiert (4.6.5) über 12% SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen E1A (A.), E2A (B.), E1B-55K (C.), E4orf6 (D.), pVI (E.), pVII (F.) inkubiert.

Um weiterhin zu untersuchen, ob möglicherweise ein Komplex aus den viralen Proteinen E1B-55K, pVII und dem zellulären Daxx gebildet wird, wurden weitere Analysen durchgeführt.

5.5.2 Interaktion des Core-Proteins pVII mit Daxx in transfizierten H1299-Zellen sowie Ad5-infizierten A549-Zellen

Wie bereits erwähnt ist pVII in der frühen Phase der Ad5 Infektion an das adenovirale Genom assoziiert und unterstützt den Rezeptor-vermittelten Import der viralen Erbinformationen in den Zellkern der Wirtszelle über drei NLS-Sequenzabschnitte im C-terminalen Bereich des Proteins. Es wird kontrovers diskutiert, ob noch weitere virale oder zelluläre Proteine am nukleären Import des Ad-Genoms eine Rolle spielen. Eine wichtige Komponente könnte das virale Terminale Protein (TP) darstellen, das jeweils mit den 5' Enden der Virus DNA verbunden ist und ebenfalls ein NLS Signal enthält. Allerdings wird vermutet, dass dieses Protein nicht ausreicht, um den Kerntransport des Ad-Genoms zu vermitteln. Deshalb wurde bislang nur eine unterstützende Funktion dieser viralen Komponente diskutiert (Wodrich *et al.*, 2006). Weiterhin konnte bereits gezeigt werden, dass erst durch die Dissoziation des viralen pVII Proteins von der viralen DNA im Nukleus die Transkription eingeleitet werden kann (Lee *et al.*, 2003). Der genaue Mechanismus dieses Vorgangs ist allerdings noch nicht aufgeklärt.

Um im ersten Schritt zu untersuchen, ob die Interaktion von Daxx mit pVII durch andere virale Faktoren vermittelt wird, wurden Transfektionsexperimente durchgeführt (Abb. 42). H1299-Zellen wurden mit pVII-Konstrukten, die ein zusätzliches HA-Epitop enthielten, transfiziert und 48 h p.t. geerntet. Gesamtzellextrakte wurden hergestellt und *Western Blot* Analysen durchgeführt. Das zusätzlich getestete Plasmid ppVII kodiert für die prozessierte Isoform des Core-Proteins. Es konnte beobachtet werden dass sich die Daxx-Gleichgewichtskonzentration durch Kotransfektion von pVII nicht verändert (Abb. 42A). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass pVII und seine prozessierte, um 24 AA N-terminal verkürzte Isoform ppVII in ihrem Laufverhalten im elektrophoretischen Feld nicht zu unterscheiden sind. Beide Konstrukte exprimieren das jeweilige pVII Protein zu gleichen Verhältnissen. Die Untersuchungen zur Interaktion zwischen Daxx und pVII konnten zeigen, dass durch endogenes Daxx sowohl das virale pVII (Abb. 42B, Spur 2) als auch das modifizierte

Protein ppVII (Abb. 42B, Spur 3) koimmunpräzipitiert wurden. Durch diesen Befund konnte neben E1B-55K erstmals ein weiterer viraler Interaktionspartner von Daxx in Transfektionsanalysen bestätigt werden.

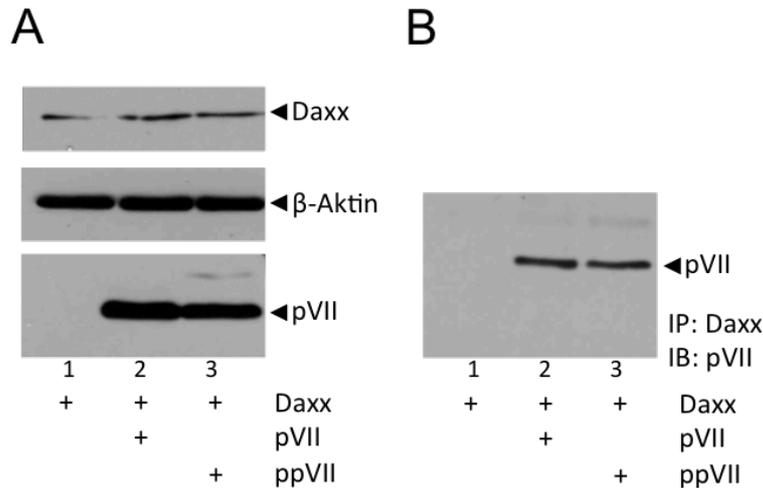


Abb. 42 Interaktion von Daxx mit dem Core Protein pVII in transfizierten H1299-Zellen

H1299- Zellen (2×10^6 Zellen) wurden mit 5 μ g Daxx (Spur 1), sowie mit 5 μ g des pVII-HA-Konstrukts (Spur 2), 5 μ g des ppVII-HA-Konstrukts (Spur 3) kotransfiziert, 48 h p.t. geerntet (4.2.5) und wie unter 4.5.2 beschrieben lysiert. Zur Überprüfung der eingesetzten Gleichgewichtsmengen (A.) wurden jeweils vom Gesamtzellextrakt 50 μ g (pVII, β -Aktin) und 100 μ g (Daxx) auf 12% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und *Western Blot* Analysen durchgeführt (4.6.4). B. Zur Koimmunpräzipitation wurde 1 mg Zellysate zuvor mit dem Daxx-Antikörper immunpräzipitiert (4.6.5) und dann über 12%ige SDS-Gele aufgetrennt, anschließend auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen pVII inkubiert.

Um die bereits beobachtete Interaktion von Daxx mit pVII genauer zu analysieren wurden zunächst Infektionsreihen mit Ad5-Wildtypvirus H5pg4100 und den E1B-Virusmutanten H5pm4149 sowie H5pm4102 in A549-Zellen durchgeführt und 20 h p.i. geerntet. Zunächst wurden Proteinexpressionsmengen durch *Western Blot* Analysen überprüft (Abb. 43A) und Koimmunpräzipitationsuntersuchungen mit Daxx (Abb. 43B) oder E1B-55K (Abb. 43C) durchgeführt. Die Untersuchungen bestätigen die Annahme einer E1B-55K-unabhängigen Daxx/pVII-Bindung, da diese auch im E1B-negativen Kontext beobachtet werden kann (Abb. 43B, Spur 3). Interessanterweise konnte pVII in H5pg4100-infizierten Zellen durch E1B-55K präzipitiert werden. Damit kann zum ersten Mal eine Interaktion dieser beiden viralen Proteine postuliert werden

(Abb. 43C, Spur 2). Im Gegensatz dazu konnten im gleichen Ansatz nur sehr geringe pVII-Proteinmengen durch Daxx immunpräzipitiert werden (Abb. 43B, Spur 2). Überraschenderweise zeigten die Ergebnisse außerdem eine verstärkte Interaktion zwischen Daxx und pVII in H5pm4102-infizierten Zellen in denen E1B-55K nicht mehr SUMO-modifiziert werden kann (Abb. 43B, Spur 4) verglichen zu Wildtyp-infizierten Zellen (Abb. 43B Spur 2). Daher könnte vermutet werden, dass Daxx, E1B-55K und pVII-abhängig von der SUMO-Modifikation von E1B-55K miteinander im Komplex vorliegen.

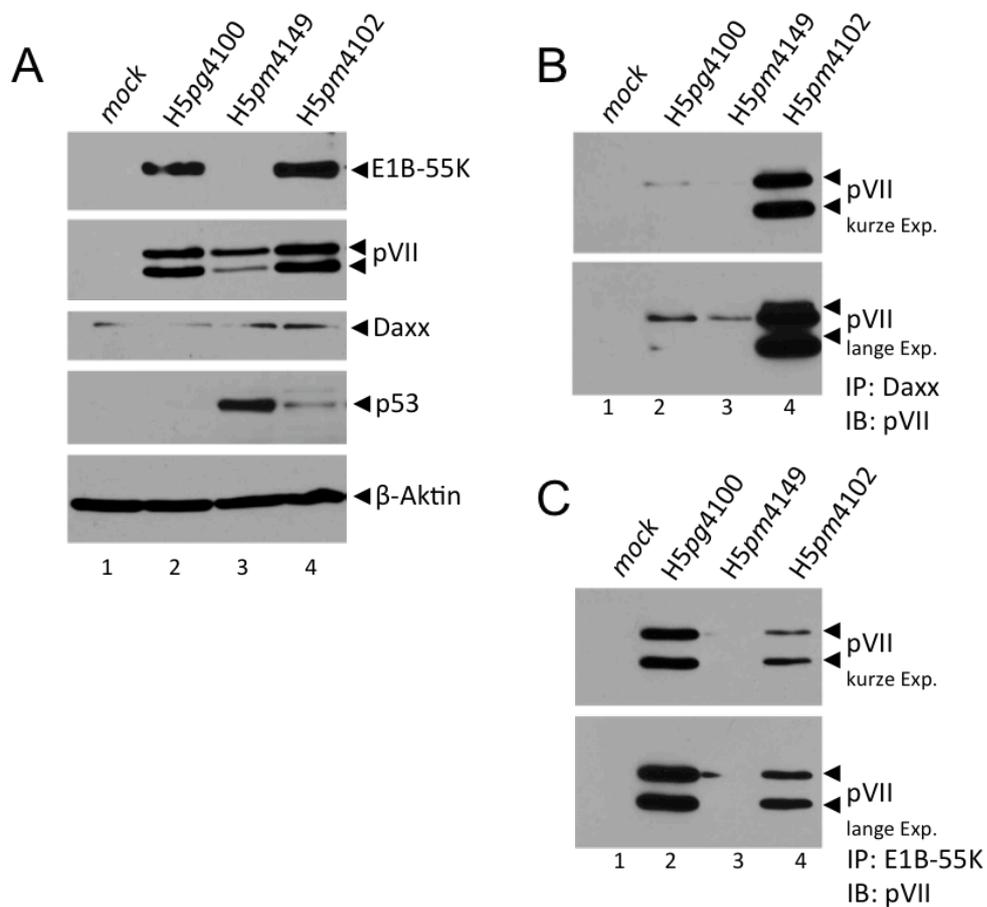


Abb. 43 Interaktion von Daxx mit dem Core-Protein pVII in infizierten A549-Zellen

A549-Zellen wurden mit H5pg4100 sowie den Virusmutanten H5pm4149 und H5pm4102 infiziert (moi 50; 4.3.4), 20 h p.i. geerntet (4.2.5) und wie unter 4.5.2 beschrieben lysiert. A. Zur Überprüfung der eingesetzten Gleichgewichtsmengen (A) wurden jeweils gleich viel Gesamtzellextrakt auf SDS-Acrylamidgelen aufgetrennt (50 µg für E1B-55K, pVII, p53, β-Aktin und 100 µg für Daxx) und auf Nitrozellulose transferiert, bevor sie mit entsprechenden Antikörpern inkubiert wurden (4.6.4). B und C. Zur Koimmunpräzipitation der verschiedenen viralen Proteine mit Daxx (B) oder E1B-55K (C) wurde das Zelllysate vor dem *Western Blot* mit den jeweiligen Antikörpern immunpräzipitiert (4.6.5) und dann über 15%ige SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit dem pVII-Antikörper inkubiert.

Die Daten unterstützen die Annahme, daß je mehr SUMO-E1B-55K detektiert werden kann, desto schlechter ist die Interaktion zwischen Daxx und pVII. Möglicherweise kooperieren die drei Proteine über SUMO und SIM Interaktionen miteinander. Da im Verlauf der frühen Ad5 Infektion die Konzentration an SUMO modifiziertem E1B-55K stetig zunimmt (Lethbridge *et al.*, 2003) könnte vermutet werden, dass Daxx von pVII abdissoziiert und die E1B-55K/Daxx-Interaktion verstärkt wird. Dies muss aber in weiterführenden Experimenten erst näher untersucht werden.

5.5.3 Hemmung der Daxx-abhängigen E1B-Promotor Repression durch das virale Core-Protein pVII

Um mögliche Einflüsse der pVII/Daxx-Interaktion auf die reprimierenden Eigenschaften von Daxx zu untersuchen wurden Reporteranalysen durchgeführt. Dazu wurden Daxx-negative Hep-Zellen wie unter 4.5 beschrieben, mit dem Plasmidvektor pGL E1B-LUC, einem artifiziellen luziferaseabhängigen E1B-Promotorkonstrukt, einem Daxx-Expressionsplasmids sowie pVII-Konstrukten kotransfiziert.

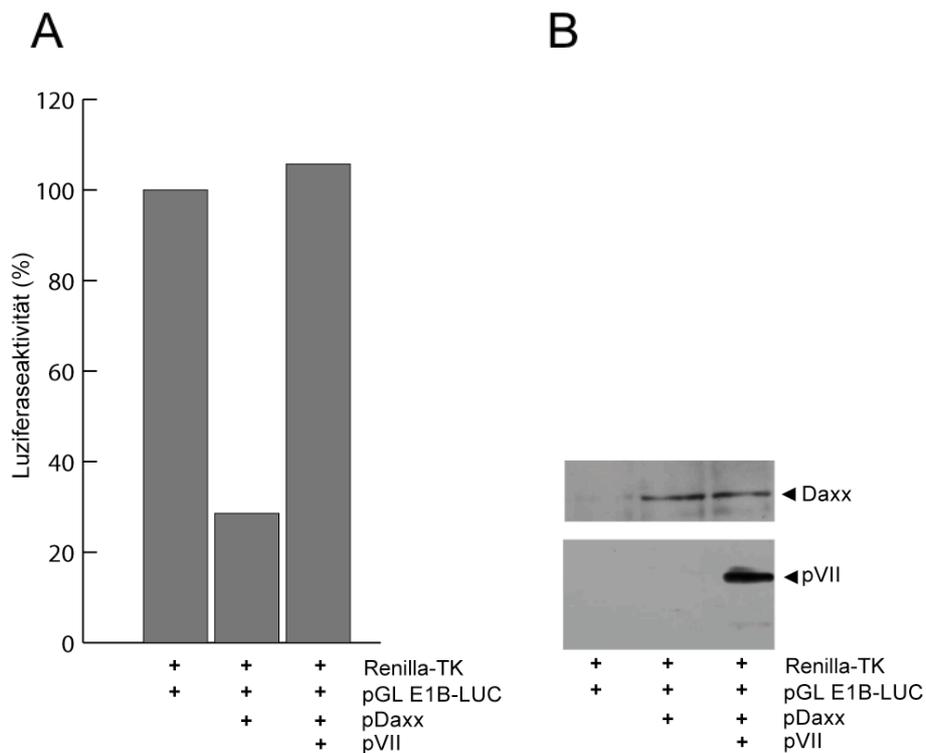


Abb. 44 pVII blockiert Daxx-abhängige Repression von pGL E1B-LUC

Hep shDaxx-Zellen wurden mit pRL-TK (interne Kontrolle), pGL E1B-LUC, Daxx und pVII nach der PEI-Methode transfiziert (4.2.4.1). 48 h p.t. wurden die Zellen mit Lyse-Puffer (Promega) aufgeschlossen und die *Firefly*-Luziferase-Aktivität mit dem *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega) bestimmt. Die *Firefly*-Luziferase-Aktivität des Reporterplasmids pGL E1B-LUC wurde als Positivkontrolle auf 100% normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen.

Nach 48 h wurde die Aktivität der *Firefly*-Luziferase luminometrisch bestimmt und die Messwerte gegen die interne *Renilla*-Luziferaseaktivität normalisiert (Abb. 44). Die E1B-Promotoraktivität wurde auf 100% normiert. Konsistent mit den bereits gezeigten Ergebnissen reprimiert Daxx den adenoviralen E1B-Promotor. Es konnten noch Restaktivitäten von 28% der Promotoraktivität detektiert werden (Abb. 44). Interessanterweise zeigen die Ergebnisse, dass die Transkriptionsrate des Reportergens durch Kotransfektion mit pVII-Konstrukten wieder verstärkt wurde. Unter den gewählten Bedingungen wurde die E1B-Promotoraktivität vollständig regeneriert im Vergleich zum Kontrollansatz ohne kotransfiziertes Daxx (Abb. 44).

Im Ganzen weisen die Beobachtungen dieses Reporterassays darauf hin, dass die vermittelte intrinsische Repressoraktivität von Daxx auf den viralen E1B-Promotor durch pVII blockiert werden kann. Möglicherweise ist die Daxx/pVII-Interaktion ein sehr frühes Ereignis im Verlauf der Ad5 Infektion und essenziell für die produktiven E1B-Genexpression.

5.5.4 Daxx unterstützt die nukleäre Akkumulation von pVII

Um eine mögliche Kolokalisation von Daxx und pVII zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt (Abb. 45). Dazu wurden Daxx-negative Hepatozyten mit Expressionsplasmiden kodierend für Daxx und pVII kotransfiziert. Die Zellen wurden 24 h p.t. fixiert und die jeweiligen Proteine immundetektiert.

Die Ergebnisse zeigten, dass pVII in Hep shDaxx-Zellen hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert. Es konnten nur sehr geringe Konzentrationen des viralen Proteins im Zellkern nachgewiesen werden. Die Untersuchung zeigte, dass pVII hauptsächlich diffus um den Nukleus der Wirtszellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 45b, c). Interessanterweise kommt es im Gegensatz dazu zu einer Änderung

dieser Lokalisation durch Kotransfektion mit dem Daxx-Expressionsplasmid. pVII konnte verstärkt im Zellkern in wenigen großen punktförmigen Strukturen detektiert werden (Abb. 45e, f). Zusätzlich konnte Daxx dagegen in vielen kleineren Aggregaten, möglicherweise PML-NBs detektiert werden. Diese Daten unterstützen die Annahme, das Daxx möglicherweise ein zellulärer Faktor ist, welcher den nukleären Import des viralen Faktors pVII unterstützt.

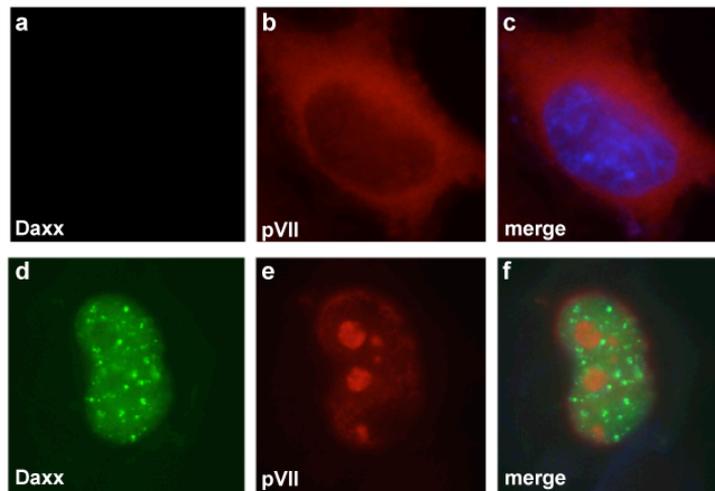


Abb. 45 Lokalisation von Daxx und pVII in transfizierten Daxx-negativen Hepatozyten

Hep shDaxx-Zellen wurden mit pVII (a, b, c) und in Kombination mit Daxx (e, f, g) nach der PEI-Methode transfiziert. 24 h p.t. wurden die Zellen methanolfixiert (4.6.6.1) und die jeweiligen Proteine mit den entsprechenden Antikörpern immungefärbt. Diese wurden dann mit einem α -Kaninchen-Texasrot- (pVII) oder FITC- (Daxx) gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Der Zellkern wurde mit dapi gefärbt und merge zeigt die Überlagerungen der entsprechenden Farbkanäle.

Während der sehr frühen Phase der Ad5 Infektion könnte pVII möglicherweise die nukleozytoplasmatische Pendelaktivität von Daxx ausnutzen und über Interaktion mit dem zellulären Faktor den Import des Ad5 Genoms verbessern.

6 Diskussion

6.1 Die E1B-55K/Daxx-Interaktion fördert die vollständige Transformation primärer BRK-Zellen

Nach heutigem Wissensstand ist die Transformation primärer Zellen durch humane Adenoviren ein mehrstufiger Prozess, der durch das kooperative Zusammenwirken der E1A- und E1B-Genprodukte gesteuert wird. Viele Ergebnisse deuten darauf hin, dass E1A alleine für die Immortalisierung und partielle Zelltransformation ausreichend ist (Gallimore *et al.*, 1984; Haley *et al.*, 1984; Moran *et al.*, 1986). Wie bereits in der Einleitung erwähnt ist die Koexpression eines E1B-Genproduktes (E1B-19K, E1B-55K) oder anderer kooperierender Onkoproteine wie beispielsweise aktiviertes ras nötig (Ruley, 1983), um den E1A-induzierten antiproliferativen Mechanismen entgegenzuwirken und einen vollständig transformierten Phänotyp zu generieren. E1B-Genprodukte sorgen somit für die Progression und Aufrechterhaltung des vollständig transformierten Phänotyps und blockieren den E1A-induzierten Zelltod (Chinnadurai, 1998; White, 1998; Williams *et al.*, 1995). Das E1B-19K-Protein ist dem zellulären Proto-Onkogen Bcl-2 funktionell ähnlich und interagiert mit den Apoptoseregulatoren Bax und CED4. Obwohl E1B-19K nicht direkt mit p53 interagiert, kann es über einen noch unbekanntem Mechanismus die p53-induzierte Transrepression aufheben, die über den C-Terminus des Tumorsuppressorproteins vermittelt wird (White, 1996).

Dem klassischen Modell zufolge korreliert die transformationsfördernde Wirkung von E1B-55K mit dessen Fähigkeit, den Tumorsuppressor p53 zu binden und die Transkription p53-abhängiger Promotoren zu reprimieren (Sarnow *et al.*, 1984; Yew *et al.*, 1992a; Yew *et al.*, 1994a). In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass diese Verringerung der Transkription durch die Interaktion mit einem zusätzlichen zellulären Korepressor vermittelt werden könnte (Martin *et al.*, 1999a). Da p53 aus

dem Zellkern in ein zytoplasmatisches perinukleäres Proteinaggregat sequestriert wird (Blair-Zajdel *et al.*, 1988; Zantema *et al.*, 1985a), kommt es möglicherweise zur Inaktivierung des Tumorsuppressorproteins. Die Rolle dieser zytoplasmatischen Restriktion von p53 ist aber immer noch unklar. Interessanterweise scheint in diesem Zusammenhang die intrinsische nukleäre Pendelaktivität von E1B-55K von Bedeutung zu sein. Diese wird zumindest teilweise durch das NES sowie die posttranslationale SUMO-1 Modifikation des E1B-55K-Proteins vermittelt. Interessanterweise führt die Inaktivierung des nukleären Exportsignals zu einer Akkumulation von E1B-55K im Zellkern sowie zu einer erhöhten SUMO-Modifikation des viralen Proteins. Diese Beobachtungen scheinen direkt gekoppelt zu sein mit einer erhöhten Repression p53-abhängiger Transkription und vollständiger Transformation in Kooperation mit E1A (Endter *et al.*, 2005; Endter *et al.*, 2001; Härtl *et al.*, 2008).

Die Bindungsstudien dieser Arbeit zeigten, dass die eingeführten AS-Austausche KK185/187AA und E472A im E1B-Polypeptid einen negativen Einfluss auf die Wechselwirkung des viralen Proteins mit Daxx haben (siehe 5.1.2). In diesen Untersuchungen konnten zwei hoch-konservierte Daxx-Interaktionsmotive im E1B-55K-Genprodukt identifiziert werden, da beide E1B-Varianten (KK185/187AA, E472A) im Gegensatz zum Wildtypprotein nicht mehr an Daxx binden (siehe 5.1.2, Abb. 9). Die E1B-55K/Daxx-Interaktion hat aber keinen Einfluss auf die Bindung mit p53 (siehe 5.1.2.2, Abb. 12). Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass die beiden E1B-Mutanten die p53-abhängige Transkription analog zum Wildtyp-Protein vollständig inhibieren (siehe 5.1.2.3, Abb. 13).

Durch frühere Arbeiten ist bereits bekannt, dass zahlreiche Repressoren ihre Funktion durch die Interaktion mit Korepressoren übermitteln. Diese rekrutieren beispielsweise HDACs an die jeweiligen Promotoren, um die Transkription durch Modifikation des Chromatins zu hemmen (Alland *et al.*, 1997; Hassig *et al.*, 1997; Heinzl *et al.*, 1997). Durch die spezifische Interaktion von Ad2 E1B-55K mit dem Korepressor mSin3A wird die Deacetylierung von Histonen durch HDACs katalysiert und die Genexpression reguliert (Punga *et al.*, 2000). Da bereits eine Homologie von Daxx zu

mSin3A sowie eine Interaktion mit HDACs nachgewiesen werden konnte (Hollenbach *et al.*, 2002), wurde überprüft, ob die AS-Austausche KK185/187AA und E472A die intrinsische Repressoraktivität des E1B-55K-Proteins beeinflussen. Diese Aktivität ist unabhängig von p53 und wird durch den C-terminalen Bereich des viralen Proteins über die Wechselwirkung mit zellulären Korepressoren vermittelt (Martin *et al.*, 1999a).

Während E1B-55K in der Lage ist die p53-unabhängige Transkription fast vollständig zu inhibieren, war diese Fähigkeit der E1B-Mutanten KK185/187AA und E472A stark reduziert (siehe 5.1.2.3, Abb. 14). Interessanterweise wird die intrinsische Repressoraktivität des E1B-55K-Proteins durch die Interaktion mit Daxx um 40% erhöht (siehe 5.1.2.3, Abb. 14). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass Daxx die p53-unabhängige Repressorfähigkeit von E1B-55K fördert. An dieser Repression könnte der zelluläre Faktor ATRX (*α-thalassemia/mental retardation syndrome protein*) beteiligt sein. ATRX und Daxx sind die Komponenten eines nukleären Komplex, welcher in der Nähe des Heterochromatins lokalisiert (Ishow, 2004). Die Assemblierung beider Proteine führt zu einer Modifikation des Chromatins und daraufhin zur Reprimierung der Genexpression auf transkriptioneller Ebene (Xue, 2003; Tang, 2004). Da es erste Hinweise auf eine Interaktion zwischen E1B-55K und ATRX gibt, wäre es vorstellbar, dass die intrinsische reprimierende Eigenschaft des viralen Proteins durch die Interaktion mit Daxx und Rekrutierung des nukleären Daxx/ATRX-Komplex vermittelt wird.

Einen hoch-interessanten Phänotyp zeigten die Daxx-Bindemutanten KK185/187AA und E472A bei der Überprüfung des transformierenden Potenzials von E1B-55K in Kooperation mit E1A. Obwohl die E1B-Mutanten p53-abhängige Promotoren (siehe 5.1.2.3, Abb. 13) reprimierten, sind sie im Gegensatz zum Wildtyp nicht mehr in der Lage die *Focus*-Bildung zu steigern (siehe 5.1.2.4, Abb. 15). Dieses Ergebnis ist nicht auf die Inhibition des Tumorsuppressors p53 durch Hemmung der Interaktion zwischen E1B-55K und p53 (siehe 5.1.2.2, Abb. 12A) oder auf die Repression p53-abhängiger Transkription zurückzuführen (siehe 5.1.2.3, Abb. 13).

Das transformierende Potenzial von E1B-55K kann auch über p53-unabhängige Mechanismen vermittelt werden. Es gibt Hinweise, dass die Bindung von E1B-55K an Mre11, eine zentrale Rolle für die vollständige Transformation primärer BRK-Zellen in Kooperation mit E1A spielt. Dies kann aber für die beiden E1B-55K/Daxx-Bindemutanten ausgeschlossen werden, da für beide E1B-Varianten eine Interaktion mit Mre11 nachgewiesen wurde (siehe 5.1.2.2, Abb. 12B).

Die Phänotypen von KK185/187AA und E472A unterstützen somit die Annahme, dass E1B-55K über einen neuen Mechanismus zur vollständigen Transformation, unabhängig von p53 und vermutlich auch unabhängig von Mre11, beiträgt.

Wahrscheinlich sind an diesem Vorgang noch andere zelluläre Proteine beteiligt. Da Daxx die intrinsischen reprimierenden Eigenschaften von E1B-55K auf transkriptioneller Ebene verstärkt (siehe 5.1.2.3, Abb. 14), könnte so die Expression anderer zellulärer Komponenten E1B-55K/Daxx-abhängig gehemmt werden. Mögliche Faktoren könnten die Daxx-Interaktoren Mdm2 oder Usp7 darstellen. In klassischen Transformationsexperimenten konnte bereits gezeigt werden, dass die Depletion von Usp7 mittels shRNA zu einem transformationsfördernden Phänotyp führt (Koyuncu, 2009a). Beobachtungen früherer Arbeiten konnten zeigen, dass Daxx direkt mit p53 und Mdm2 interagiert. Die Stabilisierung von Mdm2 durch Daxx führt zur verstärkten Mdm2-vermittelten Ubiquitylierung des Tumorsuppressors p53 und dessen Einschleusung in den proteasomalen Abbau (Ronai, 2006). Möglicherweise hat die Interaktion von E1B-55K mit Daxx sowie p53 einen positiven Einfluss auf die intrazelluläre Kolokalisation von Daxx, p53 und Mdm2. Dies würde zur verstärkten Ubiquitin-Modifikation des Tumorsuppressors führen und neben dem E1B-55K/E4orf6-E3-Ubiquitinligase-vermittelten Mechanismus zum p53-Abbau führen. Die Interaktion von E1B-55K mit Daxx und wie bereits bekannt mit Usp7 könnte ebenfalls zu einer räumlichen Annäherung beider zellulärer Komponenten führen. Dies würde zur Stabilisierung von Mdm2 durch Usp7-vermittelte Deubiquitylierung führen und ebenfalls den Abbau von p53 einleiten. Dieser Vermutung widersprechen aber Ergebnisse früherer Untersuchungen, die zeigen konnten, dass in Ad2/5 (Subgruppe C)-transformierten Säugerzellen vermehrt p53 in

zytoplasmatischen Aggregaten nachgewiesen werden konnte (Blair-Zajdel *et al.*, 1988; Zantema *et al.*, 1985a).

Weiterhin ist bereits bekannt, dass Daxx mit CKII (Casein Kinase II) interagiert und dieser Faktor für die Phosphorylierung von E1B-55K nötig ist (Zhao *et al.*, 2003). Möglicherweise ist die E1B-55K/Daxx-Interaktion für diese Modifikation fördernd, verstärkt so die E1B-vermittelte Repression der p53-abhängigen Transkription (Teodoro *et al.*, 1997b) und damit E1A/E1B-abhängige Transformation.

Daxx wurde erstmals als FAS-Rezeptor (CD95)-bindender Faktor der FAS-abhängigen Apoptose identifiziert und stellt das Adapterprotein zwischen dem stressinduzierten JNK (c-Jun N-terminale Kinase)- und dem FAS-abhängigen Zelltod dar (Yang *et al.*, 1997). Durch den E1B-55K-vermittelten Abbau von Daxx (siehe 5.3.1, Abb. 27) könnte dieser Apoptosemechanismus inhibiert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Daxx-vermittelte Aktivierung des c-Jun Kinase Signalweges durch Mitglieder der Bcl-2 Proteine gehemmt wird (Yang *et al.*, 1997). Da ein weiteres virales Genprodukt der E1-Region, E1B-19K ein Bcl-2 homologes Protein darstellt, könnte man vermuten, dass dessen antiapoptotische Eigenschaften mit der Modulation und dem Abbau von Daxx in Zusammenhang stehen. Zusätzlich zur Repression p53-abhängiger Transkription wird auf diese Weise Apoptose verhindert. Da E1B-55K für den Abbau von Daxx verantwortlich ist, könnte dadurch Apoptose verhindert und ein transformationsfördernder Phänotyp unterstützt werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Interaktion von E1B-55K mit dem zellulären Faktor Daxx nötig ist, um in Kooperation mit E1A vollständige Transformation einzuleiten. Damit konnte die Vermutung bestätigt werden, dass PML-NBs oder assoziierte Faktoren am Transformationsvorgang direkt beteiligt sind (Endter *et al.*, 2001). Die Lokalisation von E1B-55K zusammen mit p53, Mre11 und Daxx in den PML-NBs und die direkte Wechselwirkung mit diesen Faktoren führt zur zentralen Stellung der PML-NBs in der Ad5 E1A/E1B-vermittelten Transformation.

Letztendlich scheint die Analyse weiterer PML-NB-Komponenten nötig, um alle Mechanismen der E1A/E1B-abhängigen Ad5 Onkogenese zu verstehen.

6.2 Daxx ist ein zellulärer Repressor der Ad5-Replikation

Frühere Arbeiten zeigten, dass sich virale Replikationszentren vieler DNA- und RNA-Viren in unmittelbarer Nähe zu den PML-NB-Kernstrukturen befinden (Maul, 1998). Von besonderem Interesse ist hierbei die Beobachtung, dass PML-NBs im Verlauf der Virusinfektion durch virale Proteine umorganisiert oder zerstört werden, um möglicherweise antivirale Schutzmechanismen der Zelle auszuschalten (Everett, 2001; Everett *et al.*, 2006; Regad *et al.*, 2001a). Wie bei Adenoviren konnten bereits bei Humanen Papillomviren (HPV; Florin *et al.*, 2002), Herpes-Simplex Viren Typ-1 (HSV-1; Everett *et al.*, 2006), Humanen Cytomegalie Viren (HCMV; Tavalai *et al.*, 2008; Woodhall *et al.*, 2006), Varizella-Zoster Viren (VZV; Kyratsous *et al.*, 2009) und komplexen Retroviren wie den Humanen Immundefizienzviren Typ 1 (HIV-1; Huang *et al.*, 2008) sehr komplexe Vorgänge identifiziert werden, um den PML-NB-vermittelten antiviralen Mechanismen der Wirtszelle entgegenzuwirken.

Im Falle von HCMV konnte Daxx bereits als zellulärer Repressor der viralen Replikation und Zielprotein viraler Faktoren identifiziert werden. In diesen Untersuchungen wurde gezeigt, dass Daxx den viralen *major immediate early promotor* (MIEP) reprimiert und dadurch die frühe virale Genexpression hemmt (Preston *et al.*, 2006). Daxx vermittelt die Rekrutierung von HDACs an den viralen Promotor über den Transkriptionfaktor Ets1 durch Interaktion mit beiden zellulären Komponenten (Hollenbach *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2000b) und vermittelt eine HDAC-assoziierte Modifikation des Chromatins (Hollenbach *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2003). Daxx wird vom viralen Tegument-Protein pp71 gebunden und Ubiquitin-unabhängig proteasomal degradiert (Cantrell *et al.*, 2006; Hwang *et al.*, 2007). Diese Arbeit zeigt, dass auch die Replikation von Adenoviren durch Daxx gehemmt wird (siehe 5.2.2). Aufgrund der Daten kann angenommen werden, dass diese Repression der viralen Genexpression von Daxx bereits auf der Ebene der DNA-Synthese und Transkription

moduliert wird (siehe 5.2.4, Abb. 23). Da Daxx bereits den frühen Ad5 E1B-Promotor negativ reguliert (siehe 5.2.7, Abb. 26) könnte ein ähnlicher Mechanismus wie für HCMV vermutet werden.

Das Fehlen der E1B-55K-Expression in der frühen Phase der adenoviralen Infektion führt zur Beeinträchtigung der viralen Replikation. Folglich kommt es unter anderem zur Einleitung von Zellzyklusarrest und Apoptose (Debbas *et al.*, 1993; Lowe *et al.*, 1993; Rao *et al.*, 1992; Stracker *et al.*, 2002; White, 1998). Während der frühen viralen Infektion scheint die Repression des E1B-Promotors vom viralen Protein pVII unterdrückt zu werden (siehe 5.5.3, Abb. 44). Es ist bereits bekannt, dass die virale DNA-Synthese mit dem Abdissoziieren von pVII vom Ad5 Genom eingeleitet wird (Lee *et al.*, 2003). Da Daxx keine eigene DNA-Bindedomäne aufweist könnte man vermuten, dass durch das Umlokalisieren von pVII auch Daxx vom Genom entfernt wird und die reprimierende Funktion dadurch unterdrückt werden kann.

6.3 Proteasomaler Abbau von Daxx in Ad5-infizierten Zellen

Der E1B-55K/E4orf6-Proteinkomplex reguliert die virale Genexpression auf posttranslationaler Ebene, indem er den proteasomalen Abbau der zellulären Proteine p53, Mre11, DNA-Ligase IV und Integrin $\alpha 3$ induziert (Baker *et al.*, 2007; Blanchette *et al.*, 2004; Dallaire *et al.*, 2009; Harada *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997b; Querido *et al.*, 1997a; Querido *et al.*, 1997b; Steegenga *et al.*, 1998; Stracker *et al.*, 2002). Interessanterweise zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Daxx-Proteinkonzentration während der Ad5 Wildtyp Infektion ebenfalls reduziert wird (siehe 5.3.1, Abb. 27). Im Unterschied zu p53 und Mre11, zeigten die Daten eine Abbau von Daxx auch in Abwesenheit von E4orf6. Dies deutet darauf hin, dass die Daxx-Reduktion nicht oder nur teilweise mit dem vorher beschriebenen Modell des E1B-55K/E4orf6-E3-Ubiquitinligase-vermittelten Abbaus von Substratproteinen übereinstimmt. Zudem spielen die 26S-Proteasomen beim Abbau von Daxx eine wichtige Rolle, da dieser durch die Zugabe von Proteasomeninhibitoren verhindert werden kann (siehe 5.3.3, Abb. 29).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Daxx im Gegensatz zu Mre11 (Araujo *et al.*, 2005) nicht durch E1B-55K und E4orf3 an zytoplasmatische Aggresomen-ähnliche Strukturen in kernnahen Bereichen der Zelle sequestriert wird, um dort abgebaut zu werden (siehe 5.3.7, Abb. 29).

Die Assemblierung der E1B-55K/E4orf6-E3-Ubiquitinligase ist von zwei konservierten BC-Box Motiven im E4orf6-Protein abhängig, welche die Verbindung zu Elongin B und C herstellen (Blanchette *et al.*, 2004; Blanchette *et al.*, 2008). Interessanterweise konnte auch im E1B-55K-Protein bereits eine BC-Box identifiziert werden (siehe 2.3.4, Abb. 6). Möglicherweise ist dieses Motiv ausreichend, um eine E4orf6-unabhängige Verbindung mit Elongin B, C und weiteren zellulären Faktoren wie Cullin-5 (siehe 5.3.5, Abb. 32) einzugehen, um eine E3-Ubiquitinligase herzustellen und dadurch Daxx dem proteasomalen Abbau zuzuführen.

Die Daten dieser Arbeit lassen die Vermutung zu, dass dem Daxx-Abbau unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen könnten. Möglicherweise ist die Assemblierung der E1B-55K/E4orf6-E3-Ubiquitinligase oder einer E1B-55K-E3-Ubiquitinligase von der SUMO-Modifikation des E1B-55K-Proteins abhängig. Neueste Arbeiten zeigen, dass die Mutation des nukleären Kernexportsignal von E1B-55K zu einer verstärkten SUMO-Modifikation des viralen Proteins sowie zu einem verzögerten p53-Abbau führt (Kinds Müller *et al.*, 2006). Durch *Western Blot* Analysen konnte gezeigt werden, dass die SUMOylierung von E1B-55K den Daxx-Abbau positiv beeinflusst (siehe 5.3.6, Abb. 33). Dies lässt vermuten, dass durch zunehmende SUMO-Modifikation des E1B-55K-Proteins die Assemblierung des E1B-55K/E4orf6-E3-Ligasekomplexes gehemmt wird und vermehrt E1B-55K-abhängiger, E4orf6-unabhängiger Abbau von Substratproteinen stattfindet. Da sich die BC-Box von E1B-55K und die Interaktionsstelle von p53 im E1B-55K-Protein überlappen (siehe 2.3.4, Abb. 6), könnte p53 nur durch Interaktion mit E4orf6 (Dobner *et al.*, 1996) in den Abbauweg eingeschleust werden.

Eine weitere Möglichkeit ergibt sich aus der Tatsache, dass E1B-55K durch Interaktion mit einem noch unbekanntem Faktor weitere zelluläre Ligasekomplexe rekrutiert, die zur Daxx-Ubiquitylierung und zum proteasomalen Abbau führen könnten. Eine mögliche zelluläre E3-Ubiquitinligase würde RNF8 darstellen, für das bereits virale Bindungspartner identifiziert wurden (persönliche Mitteilung, Matthew Weitzman). Es konnte bereits ein möglicher Zusammenhang zwischen der SUMOylierung von Proteinen und dadurch ausgelöster Rekrutierung von Ubiquitin, Proteasomen und E3-Ubiquitinligasen gezeigt werden (Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2008). Außerdem könnte eine verstärkte Kernlokalisierung des viralen Proteins, aber auch die SUMO-abhängige Lokalisation von E1B-55K an den PML-NBs nötig für das Einschleusen von Daxx in den proteasomalen Abbau sein. Möglicherweise steht der Daxx-Abbau bei Anwesenheit von SUMO-modifizierten E1B-Formen in engem Zusammenhang mit der veränderten E1B-55K-Lokalisation, welche von der posttranskriptionellen Modifikation des viralen Proteins abhängig ist. Die SUMO-Modifikation von E1B-55K ist für die nukleäre Akkumulation des viralen Proteins nötig und führt zur Lokalisation an den PML-NBs im Zellkern (Endter *et al.*, 2005; Endter *et al.*, 2001). Da Daxx im Nukleus ebenfalls an diesen Kernstrukturen nachzuweisen ist, wäre es denkbar, dass dies die Interaktion beider Komponenten unterstützt und dadurch ein effizienterer Abbau beobachtet werden kann.

Schließlich könnte vermutet werden, dass die Reduktion der Daxx-Proteinmengen mit einer E1B-vermittelte Daxx-Sequestrierung in die nukleäre Matrix oder in andere unlösliche Zellkompartimente in Zusammenhang gebracht werden könnte. Dies ist jedoch ausgeschlossen, da durch die Behandlung der Zellen mit dem Proteasomeninhibitor MG-132, Daxx sowie klassische Substrate wie Mre11 wieder angereichert werden. Im Ganzen zeigen die Ergebnisse somit, dass Daxx über einen E1B-55K-vermittelten, Cullin-5-abhängigen, Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Mechanismus abgebaut wird.

6.4 Daxx interagiert mit pVII und L4-100K in Ad5 infizierten Zellen

E1B-55K ist für die produktive Ad5-Replikation essenziell und erfüllt die meisten seiner Funktionen vor allem in der späten Phase des Infektionszyklus. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Ad5-Wildtypvirus und die untersuchten E1B-Virusmutanten, einschließlich der E1B-Deletionsmutante H5pm4149 etwa die gleiche Menge an viraler DNA bildeten (siehe 5.4.2, Abb. 37B). Auch die Initiation der viralen DNA-Synthese fand bei allen Virusmutanten etwa zur selben Zeit statt. Frühere Untersuchungen zeigten bereits, dass E1B-55K seine für die virale Replikation entscheidenden Funktionen erst nach dem Einsetzen der viralen DNA-Synthese in der späten Phase des Replikationszyklus ausübt (Goodrum *et al.*, 1997; Goodrum *et al.*, 1998). Virusmutanten ohne funktionelles E1B-55K, zeigen erhebliche Defekte bei der Synthese viraler Strukturproteine und bei der Produktion von Nachkommenviren, da u.a. in der späten Phase der Infektion der selektive Transport viraler mRNA vom Kern ins Zytoplasma nicht gefördert werden kann (Babiss *et al.*, 1985; Leppard *et al.*, 1989; Pilder *et al.*, 1986a; Pilder *et al.*, 1986b; Yew *et al.*, 1990). Interessanterweise konnte bei beiden E1B-Virusmutanten mit verändertem Daxx-Interaktionsmotiv kein negativer Effekt auf die Synthese später viraler Strukturproteine (siehe 5.4.2, Abb. 38) und die Produktion von Nachkommenviren (siehe 5.4.2, Abb. 37A) beobachtet werden.

Da in weiteren Untersuchungen jedoch festgestellt wurde, dass auch in H5pm4197- und H5pm4198-infizierten Zellen eine indirekte Interaktion zwischen E1B-55K und Daxx (siehe 5.4.3, Abb. 40C) durch pVII oder L4-100K vermittelt wird (siehe 5.5.1, Abb. 41), kann keine Aussage über die Funktion der E1B-55K/Daxx-Bindung während der adenoviralen Infektion gemacht werden. Möglicherweise spielt die E1B-55K/Daxx-Interaktion und die damit verbundene Sequestrierung von Daxx aus den PML-NBs eine wichtige Rolle bei der Ad5-Replikation und wird durch zusätzliche virale Faktoren sichergestellt. Um einen möglichen Phänotyp von H5pm4197 und H5pm4198 in infizierten Zellen genauer untersuchen zu können, müsste im Vorfeld die Interaktion von Daxx mit den viralen Komponenten L4-100K, pVI oder pVII durch

das Einführen von Mutationen verhindert werden.

Das späte adenovirale Protein L4-100K ist für das Abschalten der zellulären Synthese verantwortlich, indem es den *Cap*-Initiationskomplex inhibiert und die virale Translation über den TPL (*tripartite leader*) unterstützt. Durch die Interaktion von L4-100K mit dem Carboxyterminus des Initiationsfaktor eIF4G wird die Anlagerung der Mnk1 Kinase an den Initiationskomplex verhindert und eIF4E dephosphoryliert (Cuesta *et al.*, 2004). Der Grund für das Abschalten der zellulären Proteinsynthese ist also die Inaktivierung des Initiationsfaktors eIF4E, der für die Translation von Transkripten mit einer 5'-*Cap*-Struktur essenziell ist. Virale Transkripte werden mit Hilfe des TPL unabhängig von eIF4E weiter translatiert (Dolph *et al.*, 1990; Dolph *et al.*, 1988; Logan *et al.*, 1984). Bislang hat man angenommen, dass eine mögliche Interaktion zwischen den viralen Faktoren E1B-55K und L4-100K Protein einen Einfluss auf die selektive Translation später viraler Transkripte haben (Koyuncu, 2009b). In Abwesenheit von E1B-55K konnte festgestellt werden, dass der Initiationsfaktor eIF4E phosphoryliert bleibt (Zhang *et al.*, 1994). Folglich könnte das E1B-55K-Protein an der Dephosphorylierung des Initiationsfaktors eIF4E und somit an der Regulation der Translation beteiligt sein. Die genaue Funktion ist jedoch noch unklar (Harada *et al.*, 1999). In dieser Arbeit konnte erstmals eine E1B-unabhängige (H5pm4149) Interaktion zwischen L4-100K und Daxx beobachtet werden (siehe 5.5.1, Abb. 41). Daxx könnte somit auch eine entscheidende Rolle bei der selektiven Translation viraler Transkripte spielen (Xi *et al.*, 2004; Xi *et al.*, 2005). Möglicherweise hemmt Daxx die Dephosphorylierung von eIF4E und damit die *Cap*-unabhängige selektive Translation später viraler Transkripte. Vermutlich gibt es einen Zusammenhang zwischen der L4-100K/Daxx-Interaktion und dem reprimierenden Effekt des zellulären Repressors auf die virale Replikation, wie sie in transformierten und nicht-transformierten Zellen bereits beobachtet werden konnte (siehe 5.2.1 bis 5.2.6).

Weiterhin ist auffällig, dass in H5pm4197- und H5pm4198-infizierten Zellen im Gegensatz zu Mre11 und p53, kein Daxx-Abbau nachgewiesen werden konnte (siehe

5.4.2, Abb. 39). Dies ist ein eindeutiger Hinweis darauf, dass eine direkte Interaktion von E1B-55K mit Daxx nötig ist, um den proteasomalen Abbau zu initiieren.

Durch diese Untersuchungen konnte möglicherweise ein allgemeiner Mechanismus von DNA Viren zur Inaktivierung von Daxx als Schutzmechanismus der Wirtszelle identifiziert werden.

6.5 Daxx: ein zentraler negativer Regulator der produktiven lytischen Infektion von Ad5

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass Daxx eine zentrale Rolle im produktiven Ad5-Lebenszyklus spielt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die vielfältigen Eigenschaften des zellulären Faktors Daxx von den viralen Komponenten E1B-55K, pVII und L4-100K moduliert werden, um maximale Virusproduktion sicherzustellen. Nach einem vorläufigem Modell lassen sich diese Vorgänge in mehrere Schritte einteilen.

Daxx kooperiert mit dem Core-Protein pVII vermutlich schon in einer sehr frühen Phase der Infektion, um möglicherweise den Import des viralen Genoms in den Zellkern der Wirtszelle zu verbessern (Abb. 46 Schritt 1; siehe auch 5.5.2, Abb. 42 und 43; 5.5.4, Abb. 45). Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass Daxx durch bestimmte Stressfaktoren, u. a. durch das Eindringen von Viruspartikeln oder fremder DNA in die Wirtszelle, an die PML-NB-Kernstrukturen rekrutiert wird, um dort zusammen mit PML den Zelltod zu initiieren (Takahashi *et al.*, 2004).

DISKUSSION

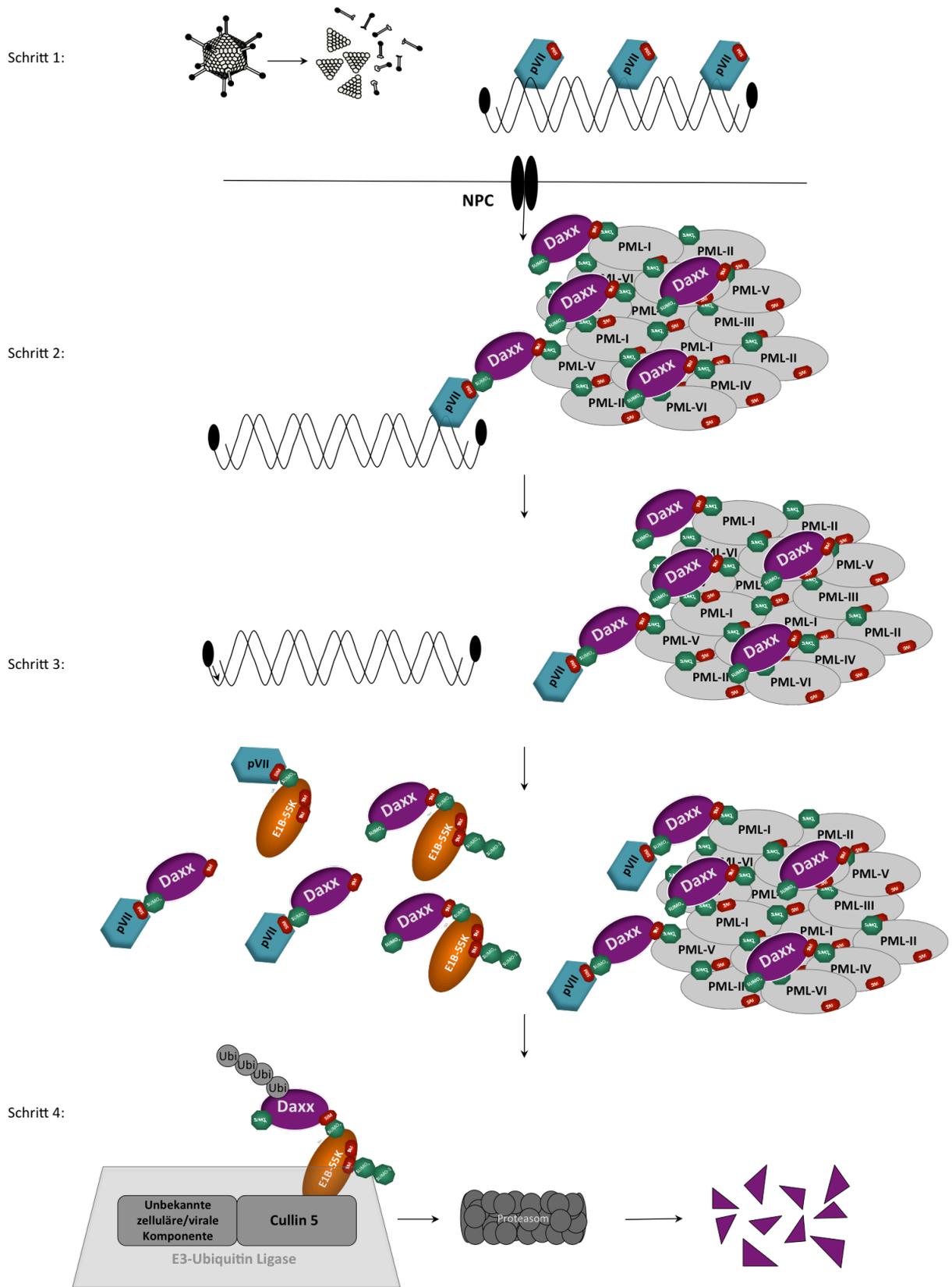


Abb. 46 Mögliche Funktionen von Daxx im produktiven Ad5-Replikationszyklus
Beschreibung siehe Text.

Demzufolge könnte Daxx im 2. Schritt nur wenn es an den PML-NBs lokalisiert, proapoptotische Eigenschaften vermitteln und den programmierten Zelltod einleiten (Kawai *et al.*, 2003). Es konnte beobachtet werden, dass sich Replikationszentren vieler Viren in der Nähe der zellulären PML-NBs befinden. Demzufolge könnte Daxx möglicherweise als Transportprotein für den Import der Ad5-DNA genutzt werden. Vermutlich gelangt das adenovirale Genom komplexiert an pVII über den zellulären Faktor Daxx vom Zytoplasma zu den PML-Kernstrukturen, in deren unmittelbarer Nähe später die viralen Replikationszentren nachzuweisen sind (Abb. 46 Schritt 2). Durch die Bindung von Daxx an pVII wird vermutlich auch dessen reprimierender Effekt auf den viralen E1B-Promotor gehemmt (Abb. 46 Schritt 2; siehe 5.5.3, Abb. 44).

Die Ergebnisse legen außerdem die Vermutung nahe, dass Daxx mit pVII und E1B-55K in einem nächsten Schritt möglicherweise über die SUMO-Modifikation von E1B regulierten Mechanismus interagieren (Abb. 46 Schritt 3; siehe 5.5.2, Abb. 43). Im Verlauf der Virusinfektion kommt es zur Bindung zwischen E1B-55K und Daxx (siehe 5.1.1, Abb. 7). Vermutlich nimmt diese Interaktion mit steigender E1B-SUMOylierung zu und führt zur Hemmung der Kooperation zwischen Daxx und pVII (siehe 5.5.2, Abb. 43). Da Daxx nur außerhalb der PML-NBs antiapoptotische Funktionen vermittelt (Kawai *et al.*, 2003) könnte die Interaktion von Daxx mit dem antiapoptotischen E1B-Protein, den Apoptosemechanismen entgegenwirken (Zhao *et al.*, 2003).

Im letzten Schritt kommt es im Verlauf der Ad5-Infektion zum Abbau von Daxx, vermittelt über einen Cullin-5-, Ubiquitin-abhängigen Mechanismus. Diese Reduktion der Daxx-Proteinmengen ist von E1B-55K und dessen SUMO-Modifikation abhängig (Abb. 46 Schritt 4; siehe 5.3.3, Abb. 29; siehe 5.3.5, Abb. 32; siehe 5.3.6, Abb. 33; siehe 5.4.3, Abb. 40). Erstmals wurde neben dem klassischen E1B-55K/E4orf6-abhängigen-E3-Ubiquitinligase-vermittelten Mechanismus ein neuer E1B-abhängiger Weg für das Einschleusen zellulärer Substrate in den proteasomalen Abbau gefunden.

7 Literaturverzeichnis

- Abe, S., K. Miyamura, T. Oba, S. Terakura, M. Kasai, K. Kitaori, T. Sasaki, and Y. Kodera. 2003. Oral ribavirin for severe adenovirus infection after allogeneic marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 32:1107-8.
- Abramoff, M.D., P.J. Magelhaes, and S.J. Ram. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International.* 11:36-42.
- Alland, L., R. Muhle, H. Hou, Jr., J. Potes, L. Chin, N. Schreiber-Agus, and R.A. DePinho. 1997. Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature.* 387:49-55.
- Ankerst, J., and N. Jonsson. 1989. Adenovirus type 9-induced tumorigenesis in the rat mammary gland related to sex hormonal state. *J. Natl. Cancer Inst.* 81:294-298.
- Araujo, F.D., T.H. Stracker, C.T. Carson, D.V. Lee, and M.D. Weitzman. 2005. Adenovirus type 5 E4orf3 protein targets the Mre11 complex to cytoplasmic aggresomes. *J. Virol.* 79:11382-11391.
- Ascoli, C.A., and G.G. Maul. 1991. Identification of a novel nuclear domain. *J. Cell. Biol.* 112:785-795.
- Avvakumov, N., R. Wheeler, J.C. D'Halluin, and J.S. Mymryk. 2002. Comparative sequence analysis of the largest E1A proteins of human and simian adenoviruses. *J. Virol.* 76:7968-7975.
- Babich, A., L.T. Feldman, J.R. Nevins, J.E. Darnell, and C. Weinberger. 1983. Effect of adenovirus on metabolism of specific host mRNAs: transport control and specific translation discrimination. *Mol. Cell. Biol.* 3:1212-1221.
- Babiss, L.E., and H.S. Ginsberg. 1984. Adenovirus type 5 early region 1b gene product is required for efficient shutoff of host protein synthesis. *J. Virol.* 50:202-212.
- Babiss, L.E., H.S. Ginsberg, and J.J. Darnell. 1985. Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport. *Mol. Cell. Biol.* 5:2552-2558.
- Bailey, A., and V. Mautner. 1994. Phylogenetic relationships among adenovirus serotypes. *Virology.* 205:438-52.
- Baker, A., K.J. Rohleder, L.A. Hanakahi, and G. Ketner. 2007. Adenovirus E4 34k and E1b 55k oncoproteins target host DNA ligase IV for proteasomal degradation. *J. Virol.* 81:7034-40.
- Beck, K.F., I. Stathopoulos, M.G. Berninger, and M. Schweizer. 1993. Overcoming GC compression in nucleotide sequencing. *Biotechniques.* 14:375.
- Bell, P., P.M. Lieberman, and G.G. Maul. 2000. Lytic but not latent replication of epstein-barr virus is associated with PML and induces sequential release of nuclear domain 10 proteins. *J. Virol.* 74:11800-10.
- Beltz, G.A., and S.J. Flint. 1979. Inhibition of HeLa cell protein synthesis during adenovirus infection: restriction of cellular messenger RNA sequences to the nucleus. *J. Mol. Biol.* 131:353-373.
- Benko, M., P. Elo, K. Ursu, W. Ahne, S.E. LaPatra, D. Thomson, and B. Harrach. 2002. First molecular evidence for the existence of distinct fish and snake adenoviruses. *J. Virol.* 76:10056-9.
- Benkö, M., and B. Harrach. 1998. A proposal for a new (third) genus within the family Adenoviridae. *Arch. Virol.* 143:829-837.
- Benkö, M., B. Harrach, and W.C. Russel. 1999. Adenoviridae. In *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, and D.H.L. Bishop, editors. Academic Press, San Diego. 227-238.
- Bergelson, J.M., J.A. Cunningham, G. Droguett, E.A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J.S. Hong, M.S. Horwitz, R.L. Crowell, and R.W. Finberg. 1997. Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science.* 275:1320-1323.
- Bernards, R., M.G. de Leeuw, M.J. Vaessen, A. Houweling, and A.J. van der Eb. 1984. Oncogenicity by adenovirus is not determined by the transforming region only. *J. Virol.* 50:847-853.
- Bernards, R., A. Houweling, P.I. Schrier, J.L. Bos, and A.J. van der Eb. 1982. Characterization of cells transformed by Ad5/Ad12 hybrid early region. *Virology.* 120:422-432.
- Beyer, W.R., M. Westphal, W. Ostertag, and D. von Laer. 2002. Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration,

- and broad host range. *J Virol.* 76:1488-95.
- Bischoff, J.R., D.H. Kirn, A. Williams, C. Heise, S. Horn, M. Muna, L. Ng, J.A. Nye, A. Sampson Johannes, A. Fattaey, and F. McCormick. 1996. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science.* 274:373-376.
- Blair-Zajdel, M.E., and G.E. Blair. 1988. The intracellular distribution of the transformation-associated protein p53 in adenovirus-transformed rodent cells. *Oncogene.* 2:579-584.
- Blanchette, P., C.Y. Cheng, Q. Yan, G. Ketner, D.A. Ornelles, T. Dobner, R.C. Conaway, J.W. Conaway, and P.E. Branton. 2004. Both BC-box motifs of adenovirus protein E4orf6 are required to assemble an E3 ligase complex that degrades p53. *Mol. Cell. Biol.* 24:9619-9629.
- Blanchette, P., K. Kindsmuller, P. Groitl, F. Dallaire, T. Speiseder, P.E. Branton, and T. Dobner. 2008. Control of mRNA export by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins during productive infection requires E4orf6 ubiquitin ligase activity. *J Virol.* 82:2642-51.
- Boisvert, F.M., M.J. Hendzel, and D.P. Bazett-Jones. 2000. Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *J Cell Biol.* 148:283-92.
- Boivin, D., M.R. Morrison, R.C. Marcellus, E. Querido, and P.E. Branton. 1999. Analysis of synthesis, stability, phosphorylation, and interacting polypeptides of the 34-kilodalton product of open reading frame 6 of the early region 4 protein of human adenovirus type 5. *J. Virol.* 73:1245-1253.
- Borden, K.L. 2002. Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol Cell Biol.* 22:5259-69.
- Borden, K.L., E.J. Campbell Dwyer, G.W. Carlile, M. Djavani, and M.S. Salvato. 1998. Two RING finger proteins, the oncoprotein PML and the arenavirus Z protein, colocalize with the nuclear fraction of the ribosomal P proteins. *J. Virol.* 72:3819-3826.
- Boyer, J.L., K. Rohleder, and G. Ketner. 1999. Adenovirus E4 34k and E4 11k inhibit double strand break repair and are physically associated with the cellular DNA-dependent protein kinase. *Virology.* 263:307-312.
- 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.
- Brusca, J.S., R. Jannun, and G. Chinnadurai. 1984. Efficient transformation of rat 3Y1 cells by human adenovirus type 9. *Virology.* 136:328-337.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., und Short, J.M. 1987. XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with b-galactosidase selection. *In Biotechniques.* Vol. 5. 376-379.
- Burgert, H.G., and J.H. Blusch. 2000. Immunomodulatory functions encoded by the E3 transcription unit of adenoviruses. *Virus Genes.* 21:13-25.
- Cadwell, K., and L. Coscoy. 2005. Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase. *Science.* 309:127-30.
- Cantrell, S.R., and W.A. Bresnahan. 2006. Human cytomegalovirus (HCMV) UL82 gene product (pp71) relieves hDaxx-mediated repression of HCMV replication. *J Virol.* 80:6188-91.
- Carson, C.T., R.A. Schwartz, T.H. Stracker, C.E. Lilley, D.V. Lee, and M.D. Weitzman. 2003. The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. *EMBO J.* 22:6610-6620.
- Carvalho, T., J.S. Seeler, K. Öhman, P. Jordan, U. Pettersson, G. Akusjärvi, M. Carmo Fonseca, and A. Dejean. 1995a. Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies. *J. Cell. Biol.* 131:45-56.
- Catalucci, D., E. Sporeno, A. Cirillo, G. Ciliberto, A. Nicosia, and S. Colloca. 2005. An adenovirus type 5 (Ad5) amplicon-based packaging cell line for production of high-capacity helper-independent deltaE1-E2-E3-E4 Ad5 vectors. *J Virol.* 79:6400-9.
- Cathomen, T., and M.D. Weitzman. 2000. A functional complex of the adenovirus proteins E1B-55kDa and E4orf6 is necessary to modulate the expression level of p53 but not its transcriptional activity. *J. Virol.* 74:11407-11412.
- Chan, J.Y., L. Li, Y.H. Fan, Z.M. Mu, W.W. Zhang, and K.S. Chang. 1997. Cell-cycle regulation of DNA damage-induced expression of the suppressor gene PML. *Biochem Biophys Res Commun.* 240:640-6.
- Chelbi-Alix, M.K., and H. de The. 1999. Herpes virus induced proteasome-dependent degradation of the nuclear bodies-associated PML and Sp100 proteins. *Oncogene.* 18:935-41.
- Chinnadurai, G. 1998. Control of apoptosis by human adenovirus genes. *Semin. Virol.* 8:399-408.
- Ciechanover, A., and K. Iwai. 2004. The ubiquitin system: from basic mechanisms to the patient bed. *IUBMB Life.* 56:193-201.

- Cohen, N., M. Sharma, A. Kentsis, J. Perez, S. Strudwick, and K.L.B. Borden. 2001. PML RING suppresses oncogenic transformation by reducing the affinity of eIF4E for mRNA. *EMBO J.* 20:4547-4559.
- Cook, J.L., D.L. May, A.M. Lewis, Jr., and T.A. Walker. 1987. Adenovirus E1A gene induction of susceptibility to lysis by natural killer cells and activated macrophages in infected rodent cells. *J. Virol.* 61:3510-3520.
- Cuesta, R., Q. Xi, and R.J. Schneider. 2004. Structural basis for competitive inhibition of eIF4G-Mnk1 interaction by the adenovirus 100-kilodalton protein. *J. Virol.* 78:7707-7716.
- D'Orazi, G., B. Cecchinelli, T. Bruno, I. Manni, Y. Higashimoto, S. Saito, M. Gostissa, S. Coen, A. Marchetti, G. Del Sal, G. Piaggio, M. Fanciulli, E. Appella, and S. Soddu. 2002. Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol.* 4:11-9.
- Dallaire, F., P. Blanchette, P. Grotl, T. Dobner, and P.E. Branton. 2009. Identification of integrin alpha3 as a new substrate of the adenovirus E4orf6/E1B 55-kilodalton E3 ubiquitin ligase complex. *J Virol.* 83:5329-38.
- Daniel, M.T., M. Koken, O. Romagne, S. Barbey, A. Bazarbachi, M. Stadler, M.C. Guillemin, L. Degos, C. Chomienne, and H. de The. 1993. PML protein expression in hematopoietic and acute promyelocytic leukemia cells. *Blood.* 82:1858-67.
- Davison, A.J., M. Benko, and B. Harrach. 2003. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol.* 84:2895-908.
- Davison, A.J., E.A. Telford, M.S. Watson, K. McBride, and V. Mautner. 1993. The DNA sequence of adenovirus type 40. *J. Mol. Biol.* 234:1308-1316.
- Day, P.M., R.B.S. Roden, D.R. Lowy, and J.T. Schiller. 1998. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J. Virol.* 72:142-150.
- de The, H., C. Lavau, A. Marchio, C. Chomienne, L. Degos, and A. Dejean. 1991. The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell.* 66:675-84.
- Debbas, M., and E. White. 1993. Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev.* 7:546-554.
- Defer, C., M.T. Belin, M.L. Caillet-Boudin, and P. Boulanger. 1990. Human adenovirus-host cell interactions: comparative study with members of subgroups B and C. *J Virol.* 64:3661-73.
- Dellaire, G., and D.P. Bazett-Jones. 2004a. PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays.* 26:963-977.
- Desbois, C., R. Rousset, F. Bantignies, and P. Jalinot. 1996. Exclusion of Int-6 from PML nuclear bodies by binding to the HTLV-I Tax oncoprotein. *Science.* 273:951-3.
- Dobbelstein, M., J. Roth, W.T. Kimberly, A.J. Levine, and T. Shenk. 1997. Nuclear export of the E1B 55-kDa and E4 34-kDa adenoviral oncoproteins mediated by a rev-like signal sequence. *EMBO J.* 16:4276-4284.
- Dobner, T., N. Horikoshi, S. Rubenwolf, and T. Shenk. 1996. Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor. *Science.* 272:1470-1473.
- Dobner, T., and J. Kzhyshkowska. 2001. Nuclear export of adenovirus RNA. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 259:25-54.
- Dolph, P.J., J.T. Huang, and R.J. Schneider. 1990. Translation by the adenovirus tripartite leader: elements which determine independence from cap-binding protein complex. *J. Virol.* 64:2669-2677.
- Dolph, P.J., V. Racaniello, A. Villamarin, F. Palladino, and R.J. Schneider. 1988. The adenovirus tripartite leader may eliminate the requirement for cap-binding protein complex during translation initiation. *J. Virol.* 62:2059-2066.
- Dosch, T., F. Horn, G. Schneider, F. Krätzer, T. Dobner, J. Hauber, and R.H. Stauber. 2001. The adenovirus type 5 E1B-55K oncoprotein actively shuttles in virus-infected cells, whereas transport of E4orf6 is mediated by a CRM1 independent-mechanism. *J. Virol.* 75:5677-5683.
- Doucas, V., and R.M. Evans. 1996a. The PML nuclear compartment and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1288:M25-9.
- Doucas, V., A.M. Ishov, A. Romo, H. Juguilon, M.D. Weitzman, R.M. Evans, and G.G. Maul. 1996b. Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure.

- Genes Dev.* 10:196-207.
- Doucas, V., M. Tini, D.A. Egan, and R.M. Evans. 1999. Modulation of CREB binding protein function by the promyelocytic (PML) oncoprotein suggests a role for nuclear bodies in hormone signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:2627-32.
- Dulbecco, R., and G. Freeman. 1959. Plaque production by the polyoma virus. *Virology.* 8:396-7.
- Dull, T., R. Zufferey, M. Kelly, R.J. Mandel, M. Nguyen, D. Trono, and L. Naldini. 1998. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol.* 72:8463-71.
- Duprez, E., S. Ruchaud, G. Houge, V. Martin-Thouvenin, F. Valensi, P. Kastner, R. Berger, and M. Lanotte. 1992. A retinoid acid 'resistant' t(15;17) acute promyelocytic leukemia cell line: isolation, morphological, immunological, and molecular features. *Leukemia.* 6:1281-7.
- Dyck, J.A., G.G. Maul, W.H. Miller, Jr., J.D. Chen, A. Kakizuka, and R.M. Evans. 1994a. A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell.* 76:333-43.
- Dyck, J.A., G.G. Maul, W.J. Miller, J.D. Chen, A. Kakizuka, and R.M. Evans. 1994b. A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell.* 78:799-811.
- Dyson, N., M. Dembski, A. Fattaey, C. Ngwu, M. Ewen, and K. Helin. 1993. Analysis of p107-associated proteins: p107 associates with a form of E2F that differs from pRB-associated E2F-1. *J Virol.* 67:7641-7.
- Enders, J.F., J.A. Bell, and J.H. Dingle. 1956. "Adenoviruses": group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science.* 124:119-120.
- Endter, C., B. Hartl, T. Spruss, J. Hauber, and T. Dobner. 2005. Blockage of CRM1-dependent nuclear export of the adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa protein augments oncogenic transformation of primary rat cells. *Oncogene.* 24:55-64.
- Endter, C., J. Kzhyshkowska, R. Stauber, and T. Dobner. 2001. SUMO-1 modification required for transformation by adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:11312-11317.
- Everett, R.D. 2001. DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies. *Oncogene.* 20:7266-73.
- Everett, R.D., and M.K. Chelbi-Alix. 2007. PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie.* 89:819-30.
- Everett, R.D., and G.G. Maul. 1994. HSV-1 IE protein Vmw110 causes redistribution of PML. *EMBO J.* 13:5062-9.
- Everett, R.D., S. Rechter, P. Papior, N. Tavalai, T. Stamminger, and A. Orr. 2006. PML contributes to a cellular mechanism of repression of herpes simplex virus type 1 infection that is inactivated by ICP0. *J Virol.* 80:7995-8005.
- Fagioli, M., M. Alcalay, P.P. Pandolfi, L. Venturini, A. Mencarelli, A. Simeone, D. Acampora, F. Grignani, and P.G. Pelicci. 1992. Alternative splicing of PML transcripts predicts coexpression of several carboxy-terminally different protein isoforms. *Oncogene.* 7:1083-91.
- Fallaux, F.J., A. Bout, I. van der Velde, D.J. van den Wollenberg, K.M. Hehir, J. Keegan, C. Auger, S.J. Cramer, H. van Ormondt, A.J. van der Eb, D. Valerio, and R.C. Hoeben. 1998. New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum. Gene Ther.* 9:1909-1917.
- Fallaux, F.J., O. Kranenburg, S.J. Cramer, A. Houweling, H. Van Ormondt, R.C. Hoeben, and A.J. Van Der Eb. 1996. Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 7:215-222.
- Farmer, G., H. Bargonetti, H. Zhu, P. Friedman, R. Prywes, and C. Prives. 1992. Wild-type p53 activates transcription in vitro. *Nature.* 358:83-86.
- Ferbeyre, G., E. de Stanchina, E. Querido, N. Baptiste, C. Prives, and S.W. Lowe. 2000. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev.* 14:2015-27.
- Flenghi, L., M. Fagioli, L. Tomassoni, S. Pileri, M. Gambacorta, R. Pacini, F. Grignani, T. Casini, P.F. Ferrucci, M.F. Martelli, and et al. 1995. Characterization of a new monoclonal antibody (PG-M3) directed against the aminoterminal portion of the PML gene product: immunocytochemical evidence for high expression of PML proteins on activated macrophages, endothelial cells, and epithelia. *Blood.* 85:1871-80.
- Flint, S.J., and R.A. Gonzalez. 2003. Regulation of mRNA production by the adenoviral E1B 55-kDa and

- E4 Orf6 proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 272:287-330.
- Florin, L., F. Schafer, K. Sotlar, R.E. Streeck, and M. Sapp. 2002. Reorganization of nuclear domain 10 induced by papillomavirus capsid protein I2. *Virology.* 295:97-107.
- Fogh, J., J.M. Fogh, and T. Orfeo. 1977. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst.* 59:221-6.
- Gallimore, P.H., P.J. Byrd, and R.J.A. Grand. 1984. Adenovirus genes involved in transformation. What determines the oncogenic phenotype? In *Viruses and Cancer. Symposium of the Society for General Microbiology.* P.W.J. Rigby, editor. Cambridge University Press, Cambridge. 125-172.
- Gallimore, P.H., P.J. Byrd, J.L. Whittaker, and R.J. Grand. 1985. Properties of rat cells transformed by DNA plasmids containing adenovirus type 12 E1 DNA or specific fragments of the E1 region: comparison of transforming frequencies. *Cancer Res.* 45:2670-2680.
- Gallimore, P.H., R.J. Grand, and P.J. Byrd. 1986. Transformation of human embryo retinoblasts with simian virus 40, adenovirus and ras oncogenes. *Anticancer Res.* 6:499-508.
- Garnett, C.T., G. Talekar, J.A. Mahr, W. Huang, Y. Zhang, D.A. Ornelles, and L.R. Gooding. 2009. Latent species C adenoviruses in human tonsil tissues. *J Virol.* 83:2417-28.
- Giard, R.J., S.A. Aaronson, G.J. Todaro, P. Arnstein, J.H. Kersey, H. Dosik, and W.P. Parks. 1973. *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 51:1417-1423.
- Gillespie, S.M., Y. Chang, G. Lemp, R. Arthur, S. Buchbinder, A. Steimle, J. Baumgartner, T. Rando, D. Neal, G. Rutherford, and et al. 1991. Progressive multifocal leukoencephalopathy in persons infected with human immunodeficiency virus, San Francisco, 1981-1989. *Ann Neurol.* 30:597-604.
- Goddard, A.D., J. Borrow, P.S. Freemont, and E. Solomon. 1991. Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. *Science.* 254:1371-4.
- Goldberg, A.L., T.N. Akopian, A.F. Kisselev, and D.H. Lee. 1997. Protein degradation by the proteasome and dissection of its in vivo importance with synthetic inhibitors. *Mol Biol Rep.* 24:69-75.
- Gonzalez, R.A., and S.J. Flint. 2002. Effects of mutations in the adenoviral E1B 55-kilodalton protein coding sequence on viral late mRNA metabolism. *J. Virol.* 76:4507-4519.
- Gooding, L.R., and W.S. Wold. 1990. Molecular mechanisms by which adenoviruses counteract antiviral immune defenses. *Crit. Rev. Immunol.* 10:53-71.
- Goodrum, F.D., and D.A. Ornelles. 1997. The early region 1B 55-kilodalton oncoprotein of adenovirus relieves growth restrictions imposed on viral replication by the cell cycle. *J. Virol.* 71:548-561.
- Goodrum, F.D., and D.A. Ornelles. 1998. p53 status does not determine outcome of E1B 55-Kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *J. Virol.* 72:9479-9490.
- Goodrum, F.D., T. Shenk, and D.A. Ornelles. 1996. Adenovirus early region 4 34-kilodalton protein directs the nuclear localization of the early region 1B 55-kilodalton protein in primate cells. *J. Virol.* 70:6323-6335.
- Gostissa, M., M. Morelli, F. Mantovani, E. Guida, S. Piazza, L. Collavin, C. Brancolini, C. Schneider, and G. Del Sal. 2004. The transcriptional repressor hDaxx potentiates p53-dependent apoptosis. *J Biol Chem.* 279:48013-23.
- Graham, F.L. 1984. Transformation by and oncogenicity of human adenoviruses. In *The adenoviruses.* H.S. Ginsberg, editor. Plenum Press, New York. 339-398.
- Graham, F.L., J. Smiley, W.C. Russel, and R. Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36:59-72.
- Grand, R.J., and P.H. Gallimore. 1984. Adenovirus type 12 early region 1 proteins: a study of their subcellular localization and protein-protein interactions. *J. Gen. Virol.* 65:2149-2166.
- Grand, R.J., M.L. Grant, and P.H. Gallimore. 1994. Enhanced expression of p53 in human cells infected with mutant adenoviruses. *Virology.* 203:229-240.
- Gripon, P., S. Rumin, S. Urban, J. Le Seyec, D. Glaise, I. Cannie, C. Guyomard, J. Lucas, C. Trepo, and C. Guguen-Guillouzo. 2002. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:15655-60.
- Grobelny, J.V., A.K. Godwin, and D. Broccoli. 2000. ALT-associated PML bodies are present in viable cells and are enriched in cells in the G(2)/M phase of the cell cycle. *J Cell Sci.* 113 Pt 24:4577-85.
- Groitel, P., and T. Dobner. 2007. Construction of adenovirus type 5 early region 1 and 4 virus mutants. *Methods Mol Med.* 130:29-39.

- Grotzinger, T., K. Jensen, and H. Will. 1996. The interferon (IFN)-stimulated gene Sp100 promoter contains an IFN-gamma activation site and an imperfect IFN-stimulated response element which mediate type I IFN inducibility. *J Biol Chem.* 271:25253-60.
- Guillouzo, A., A. Corlu, C. Aninat, D. Glaise, F. Morel, and C. Guguen-Guillouzo. 2007. The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact.* 168:66-73.
- Gustafsson, B., W. Huang, G. Bogdanovic, F. Gauffin, A. Nordgren, G. Talekar, D.A. Ornelles, and L.R. Gooding. 2007. Adenovirus DNA is detected at increased frequency in Guthrie cards from children who develop acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer.* 97:992-4.
- Haley, K.P., J. Overhauser, L.E. Babiss, H.S. Ginsberg, and N.C. Jones. 1984. Transformation properties of type 5 adenovirus mutants that differentially express the E1A gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 81:5734-5738.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hanahan, D., and M. Meselson. 1983. Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol.* 100:333-42.
- Harada, J.N., and A.J. Berk. 1999. p53-independent and -dependent requirements for E1B-55k in adenovirus type 5 replication. *J. Virol.* 73:5333-5344.
- Harada, J.N., A. Shevchenko, D.C. Pallas, and A.J. Berk. 2002. Analysis of the adenovirus E1B-55K-anchored proteome reveals its link to ubiquitination machinery. *J. Virol.* 76:9194-9206.
- Harlow, E., B.R. Franza, Jr., and C. Schley. 1985. Monoclonal antibodies specific for adenovirus early region 1A proteins: extensive heterogeneity in early region 1A products. *J. Virol.* 55:533-546.
- Harlow, E., and D. Lane. 1988. *In Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 139-318.
- Härtl, B., T. Zeller, P. Blanchette, E. Kremmer, and T. Dobner. 2008. Adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa oncoprotein can promote cell transformation by a mechanism independent from blocking p53-activated transcription. *Oncogene.* 27:3673-84.
- Hassig, C.A., T.C. Fleischer, A.N. Billin, S.L. Schreiber, and D.E. Ayer. 1997. Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A. *Cell.* 89:341-7.
- Heinzel, T., R.M. Lavinsky, T.M. Mullen, M. Soderstrom, C.D. Laherty, J. Torchia, W.M. Yang, G. Brard, S.D. Ngo, J.R. Davie, E. Seto, R.N. Eisenman, D.W. Rose, C.K. Glass, and M.G. Rosenfeld. 1997. A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature.* 387:43-8.
- Hershko, A., and A. Ciechanover. 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 67:425-79.
- Hilleman, M.R., and J.H. Werner. 1954. Recovery of new agents from patients with acute respiratory illness. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 85:183-188.
- Hodges, M., C. Tissot, K. Howe, D. Grimwade, and P.S. Freemont. 1998. Structure, organization, and dynamics of promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Am J Hum Genet.* 63:297-304.
- Hollenbach, A.D., C.J. McPherson, E.J. Mientjes, R. Iyengar, and G. Grosveld. 2002. Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core histones and the chromatin-associated protein Dek. *J Cell Sci.* 115:3319-30.
- Hollenbach, A.D., J.E. Sublett, C.J. McPherson, and G. Grosveld. 1999. The Pax3-FKHR oncoprotein is unresponsive to the Pax3-associated repressor hDaxx. *EMBO J.* 18:3702-11.
- Horwitz, M.S. 1996. Adenoviruses. *In Virology.* Vol. 2. B.N. Fields, D.M. Knipe, and P.M. Howley, editors. Lippincott-Raven, New York. 2149-2171.
- Houweling, A., P.J. van den Elsen, and A.J. van der Eb. 1980. Partial transformation of primary rat cells by the leftmost 4.5% fragment of adenovirus 5 DNA. *Virology.* 105:537-550.
- Howe, J.A., J.S. Mymryk, C. Egan, P.E. Branton, and S.T. Bayley. 1990. Retinoblastoma growth suppressor and a 300-kDa protein appear to regulate cellular DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:5883-5887.
- Huang, J.T., and R.J. Schneider. 1990. Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis is prevented by the drug 2-aminopurine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:7115-9.
- Huang, L., G.L. Xu, J.Q. Zhang, L. Tian, J.L. Xue, J.Z. Chen, and W. Jia. 2008. Daxx interacts with HIV-1 integrase and inhibits lentiviral gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 373:241-5.
- Huebner, R.J., W.P. Rowe, T.G. Ward, R.H. Parrot, and J.A. Bell. 1954. Adenoidal-pharyngeal conjunctival agents. *N. Engl. J. Med.* 251:1077-1086.

- Hwang, J., and R.F. Kalejta. 2007. Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of Daxx by the viral pp71 protein in human cytomegalovirus-infected cells. *Virology*. 367:334-8.
- Ishov, A.M., and G.G. Maul. 1996. The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition. *J Cell Biol*. 134:815-26.
- Ishov, A.M., A.G. Sotnikov, D. Negorev, O.V. Vladimirova, N. Neff, T. Kamitani, E.T. Yeh, J.F. Strauss, 3rd, and G.G. Maul. 1999. PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol*. 147:221-34.
- Ishov, A.M., R.M. Stenberg, and G.G. Maul. 1997. Human cytomegalovirus immediate early interaction with host nuclear structures: definition of an immediate transcript environment. *J Cell Biol*. 138:5-16.
- Jakoby, W.B., and I.H. Pastan. 1979. Cell culture. Methods in enzymology. Academic press, Inc., San Diego, California.
- Javier, R.T., K. Raska, Jr., G.J. Macdonald, and T. Shenk. 1991. Human adenovirus type 9-induced rat mammary tumors. *J. Virol*. 65:3192-3202.
- Jensen, K., C. Shiels, and P.S. Freemont. 2001a. PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene*. 20:7223-33.
- Jensen, K., C. Shiels, and P.S. Freemont. 2001b. PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene*. 20:7223-7233.
- Kakizuka, A., W.H. Miller, Jr., K. Umehono, R.P. Warrell, Jr., S.R. Frankel, V.V. Murty, E. Dmitrovsky, and R.M. Evans. 1991. Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell*. 66:663-74.
- Kamitani, T., K. Kito, H.P. Nguyen, H. Wada, T. Fukuda-Kamitani, and E.T. Yeh. 1998a. Identification of three major sentrinization sites in PML. *J Biol Chem*. 273:26675-82.
- Kamitani, T., H.P. Nguyen, K. Kito, T. Fukuda-Kamitani, and E.T. Yeh. 1998b. Covalent modification of PML by the sentrin family of ubiquitin-like proteins. *J Biol Chem*. 273:3117-20.
- Kao, C.C., P.R. Yew, and A.J. Berk. 1990a. Domains required for in vitro association between the cellular p53 and the adenovirus 2 E1B 55K proteins. *Virology*. 179:806-14.
- Kawai, T., S. Akira, and J.C. Reed. 2003. ZIP kinase triggers apoptosis from nuclear PML oncogenic domains. *Mol Cell Biol*. 23:6174-86.
- Khelifi, A.F., M.S. D'Alcontres, and P. Salomoni. 2005. Daxx is required for stress-induced cell death and JNK activation. *Cell Death Differ*. 12:724-33.
- Kim, H.J., S.C. Lim, S.H. Kim, and T.Y. Kim. 2003. Induction of apoptosis and expression of cell cycle regulatory proteins in response to a phytosphingosine derivative in HaCaT human keratinocyte cells. *Mol Cells*. 16:331-7.
- Kindsmüller, K., P. Groitl, B. Härtl, P. Blanchette, J. Hauber, and T. Dobner. 2006. Intranuclear targeting and nuclear export of the adenovirus E1B-55K protein is regulated by SUMO1 conjugation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:6684-9.
- Kindsmüller, K., S. Schreiner, F. Leinenkugel, P. Groitl, E. Kremmer, and T. Dobner. 2009. A 49-kilodalton isoform of the adenovirus type 5 early region 1B 55-kilodalton protein is sufficient to support virus replication. *J Virol*. 83:9045-56.
- Koken, M.H., F. Puvion-Dutilleul, M.C. Guillemin, A. Viron, G. Linares-Cruz, N. Stuurman, L. de Jong, C. Szosteki, F. Calvo, C. Chomienne, and et al. 1994. The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion. *EMBO J*. 13:1073-83.
- König, C., J. Roth, and M. Döbelstein. 1999. Adenovirus type 5 E4orf3 protein relieves p53 inhibition by E1B-55-kilodalton protein. *J. Virol*. 73:2253-2262.
- Korioth, F., G.G. Maul, B. Plachter, T. Stamminger, and J. Frey. 1996. The nuclear domain 10 (ND10) is disrupted by the human cytomegalovirus gene product IE1. *Exp Cell Res*. 229:155-8.
- Kosulin, K., C. Haberler, J.A. Hainfellner, G. Amann, S. Lang, and T. Lion. 2007. Investigation of adenovirus occurrence in pediatric tumor entities. *J Virol*. 81:7629-35.
- Koyuncu, E. 2009a. Ubiquitin-specific Protease 7 Plays a Critical Role in Control of Lytic Infection and Cell Transformation by Human Adenovirus Type 5.
- Koyuncu, O. 2009b. Role of the Adenovirus Type 5 L4-100K Protein During Lytic Infection.
- Krätzer, F., T. Dosch, J. Kzhyshkowska, G. Schneider, M. Brenner, T. Dobner, J. Hauber, and R. Stauber. 2001. The adenovirus E1B-55K binding protein E1B-AP5: a mobile tumor suppressor containing multiple import signals and a CRM1-dependent export signal. In ICRF/UCSF 2001 DNA Tumour Virus Meeting, Cambridge, England.

- Krätzer, F., O. Rosorius, P. Heger, N. Hirschmann, T. Dobner, J. Hauber, and R.H. Stauber. 2000. The adenovirus type 5 E1B-55k oncoprotein is a highly active shuttle protein and shuttling is independent of E4orf6, p53 and Mdm2. *Oncogene*. 19:850-857.
- Kuhlmann, I., S. Achten, R. Rudolph, and W. Dörfler. 1982. Tumor induction by human adenovirus type 12 in hamsters: loss of the viral genome from adenovirus type 12-induced tumor cells is compatible with tumor formation. *EMBO J.* 1:79-86.
- Kyratsous, C.A., and S.J. Silverstein. 2009. Components of nuclear domain 10 bodies regulate varicella-zoster virus replication. *J Virol.* 83:4262-74.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-5.
- Lafarga, M., M.T. Berciano, E. Pena, I. Mayo, J.G. Castano, D. Bohmann, J.P. Rodrigues, J.P. Tavanez, and M. Carmo-Fonseca. 2002. Clastosome: a subtype of nuclear body enriched in 19S and 20S proteasomes, ubiquitin, and protein substrates of proteasome. *Mol Biol Cell.* 13:2771-82.
- Lalioti, V.S., S. Vergarajauregui, D. Pulido, and I.V. Sandoval. 2002. The insulin-sensitive glucose transporter, GLUT4, interacts physically with Daxx. Two proteins with capacity to bind Ubc9 and conjugated to SUMO1. *J Biol Chem.* 277:19783-91.
- Lallemant-Breitenbach, V., M. Jeanne, S. Benhenda, R. Nasr, M. Lei, L. Peres, J. Zhou, J. Zhu, B. Raught, and H. de The. 2008. Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat Cell Biol.* 10:547-55.
- Lallemant-Breitenbach, V., J. Zhu, F. Puvion, M. Koken, N. Honore, A. Doubeikovsky, E. Duprez, P.P. Pandolfi, E. Puvion, P. Freemont, and H. de The. 2001. Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *J. Exp. Med.* 193:1361-1371.
- LaMorte, V.J., J.A. Dyck, R.L. Ochs, and R.M. Evans. 1998. Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:4991-6.
- Lavau, C., A. Marchio, M. Fagioli, J. Jansen, B. Falini, P. Lebon, F. Grosveld, P.P. Pandolfi, P.G. Pelicci, and A. Dejean. 1995. The acute promyelocytic leukaemia-associated PML gene is induced by interferon. *Oncogene*. 11:871-6.
- Lee, T.W., G.E. Blair, and D.A. Matthews. 2003. Adenovirus core protein VII contains distinct sequences that mediate targeting to the nucleus and nucleolus, and colocalization with human chromosomes. *J Gen Virol.* 84:3423-8.
- Leppard, K.N., and R.D. Everett. 1999. The adenovirus type 5 E1b 55K and E4 Orf3 proteins associate in infected cells and affect ND10 components. *J. Gen. Virol.* 80:997-1008.
- Leppard, K.N., and T. Shenk. 1989. The adenovirus E1B 55 kd protein influences mRNA transport via an intranuclear effect on RNA metabolism. *EMBO J.* 8:2329-2336.
- Lethbridge, K.J., G.E. Scott, and K.N. Leppard. 2003. Nuclear matrix localization and SUMO-1 modification of adenovirus type 5 E1b 55K protein are controlled by E4 Orf6 protein. *J. Gen. Virol.* 84:259-268.
- Li, H., C. Leo, J. Zhu, X. Wu, J. O'Neil, E.J. Park, and J.D. Chen. 2000a. Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Mol Cell Biol.* 20:1784-96.
- Li, R., H. Pei, D.K. Watson, and T.S. Papas. 2000b. EAP1/Daxx interacts with ETS1 and represses transcriptional activation of ETS1 target genes. *Oncogene*. 19:745-53.
- Liebermann, H., R. Mentel, L. Dohner, S. Modrow, and W. Seidel. 1996. Inhibition of cell adhesion to the virus by synthetic peptides of fiber knob of human adenovirus serotypes 2 and 3 and virus neutralisation by anti-peptide antibodies. *Virus Res.* 45:111-22.
- Liu, J.-H., Z.-M. Mu, and K.-S. Chang. 1995. PML suppresses oncogenic transformation of NIH/3T3 cells by activated neu. *J. Exp. Med.* 181:1965-1973.
- Liu, Y., A.L. Colosimo, X.J. Yang, and D. Liao. 2000. Adenovirus E1B 55-kilodalton oncoprotein inhibits p53 acetylation by PCAF. *Mol. Cell. Biol.* 20:5540-5553.
- Liu, Y., A. Shevchenko, A. Shevchenko, and A.J. Berk. 2005. Adenovirus exploits the cellular aggresome response to accelerate inactivation of the MRN complex. *J. Virol.* 79:14004-14016.
- Logan, J., and T. Shenk. 1984. Adenovirus tripartite leader sequence enhances translation of mRNAs late after infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:3655-3659.
- Lowe, S.W., and H.E. Ruley. 1993. Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev.* 7:535-545.
- Maheswaran, S., C. Englert, S.B. Lee, R.M. Ezzel, J. Settleman, and D.A. Haber. 1998. E1B 55K

- sequesters WT1 along with p53 within a cytoplasmic body in adenovirus-transformed kidney cells. *Oncogene*. 16:2041-2050.
- Marcellus, R.C., J.G. Teodoro, T. Wu, D.E. Brough, G. Ketner, G.C. Shore, and P.E. Branton. 1996. Adenovirus type 5 early region 4 is responsible for E1A-induced p53-independent apoptosis. *J. Virol.* 70:6207-6215.
- Marshall, L.J., A.C. Moore, M. Ohki, I. Kitabayashi, D. Patterson, and D.A. Ornelles. 2008. RUNX1 permits E4orf6-directed nuclear localization of the adenovirus E1B-55K protein and associates with centers of viral DNA and RNA synthesis. *J. Virol.* 82:6395-408.
- Martin, M.E., and A.J. Berk. 1998. Adenovirus E1B 55K represses p53 activation in vitro. *J. Virol.* 72:3146-3154.
- Martin, M.E., and A.J. Berk. 1999a. Corepressor required for adenovirus E1B 55,000-molecular-weight protein repression of basal transcription. *Mol. Cell. Biol.* 19:3403-3414.
- Marton, M.J., S.B. Baim, D.A. Ornelles, and T. Shenk. 1990. The adenovirus E4 17-kilodalton protein complexes with the cellular transcription factor E2F, altering its DNA-binding properties and stimulating E1A-independent accumulation of E2 mRNA. *J. Virol.* 64:2345-2359.
- Mathias, P., T. Wickham, M. Moore, and G. Nemerow. 1994. Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. *J. Virol.* 68:6811-4.
- Matthews, J.M., and M. Sunde. 2002. Zinc fingers--folds for many occasions. *IUBMB Life*. 54:351-5.
- Maul, G.G. 1998. Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication. *BioEssays*. 20:8:660-667.
- Maul, G.G., H.H. Guldner, and J.G. Spivack. 1993. Modification of discrete nuclear domains induced by herpes simplex virus type 1 immediate early gene 1 product (ICP0). *J Gen Virol.* 74 (Pt 12):2679-90.
- Maul, G.G., A.M. Ishov, and R.D. Everett. 1996. Nuclear domain 10 as preexisting potential replication start sites of herpes simplex virus type-1. *Virology*. 217:67-75.
- Maul, G.G., D. Negorev, P. Bell, and A.M. Ishov. 2000. Review: Properties and assembly mechanisms of ND10, PML bodies, or PODs. *J. Struct. Biol.* 129:278-287.
- McLorie, W., C.J. McGlade, D. Takayesu, and P.E. Branton. 1991. Individual adenovirus E1B proteins induce transformation independently but by additive pathways. *J. Gen. Virol.* 72:1467-1471.
- Melchior, F. 2000a. SUMO - nonclassical ubiquitin. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 16:591-626.
- Melchior, F. 2000b. SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 16:591-626.
- Melnick, A., and J.D. Licht. 1999. Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 93:3167-215.
- Michaelson, J.S., and P. Leder. 2003. RNAi reveals anti-apoptotic and transcriptionally repressive activities of DAXX. *J Cell Sci.* 116:345-52.
- Miller, D.L., C.L. Myers, B. Rickards, H.A. Collier, and S.J. Flint. 2007. Adenovirus type 5 exerts genome-wide control over cellular programs governing proliferation, quiescence, and survival. *Genome Biol.* 8:R58.
- Mitsudomi, T., S.M. Steinberg, M.M. Nau, D. Carbone, D. D'Amico, H.K. Bodner, H.K. Oie, R.I. Linnoila, J.L. Mulshine, J.D. Minna, and A.F. Gazdar. 1992. p53 gene mutations in non-small-lung cell cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene*. 7:171-180.
- Moore, M., N. Horikoshi, and T. Shenk. 1996. Oncogenic potential of the adenovirus E4orf6 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:11295-11301.
- Moran, E. 1993. Interaction of adenoviral proteins with pRB and p53. *Faseb J.* 7:880-885.
- Moran, E., T. Grodzicker, R.J. Roberts, M.B. Mathews, and B. Zerler. 1986. Lytic and transforming functions of individual products of the adenovirus E1A gene. *J. Virol.* 57:765-775.
- Müller, S., C. Hoege, G. Pyrowolakis, and S. Jentsch. 2001. SUMO, ubiquitin's mysterious cousins. *Nature*. 2:202-210.
- Muller, S., M.J. Matunis, and A. Dejean. 1998. Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *Embo J.* 17:61-70.
- Negorev, D., and G.G. Maul. 2001. Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot. *Oncogene*. 20:7234-42.
- Nevels, M. 1999. Oncogenes Potential des E4orf6- und E4orf3-Proteins von Adenovirus Typ 5. In Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene. Universität Regensburg.
- Nevels, M., S. Rubenwolf, T. Spruss, H. Wolf, and T. Dobner. 1997a. The adenovirus type 5 E4orf6

- protein cooperates with E1A and E1B proteins in the oncogenic transformation of primary rodent cells. *J. Cancer Res. and Clin. Oncol.* 123.
- Nevels, M., T. Spruss, H. Wolf, and T. Dobner. 1997b. The adenovirus E4orf6 protein increases the tumorigenicity of transformed rat cells by destabilizing the p53 tumor suppressor.
- Nevels, M., B. Täuber, E. Kremmer, T. Spruss, H. Wolf, and T. Dobner. 1999. Transforming potential of the adenovirus type 5 E4orf3 protein. *J. Virol.* 73:1591-1600.
- Nevels, M., B. Täuber, T. Spruss, H. Wolf, and T. Dobner. 2001. "Hit-and-run" transformation by adenovirus oncogenes. *J. Virol.* 75:3089-3094.
- Nevins, J.R. 1992. A closer look at E2F. *Nature.* 358:375-376.
- Nevins, J.R., and P.K. Vogt. 1996. Cell transformation by viruses. In *Virology*. Vol. 1. B.N. Fields, D.M. Knipe, and P.M. Howley, editors. Lippincott-Raven, New York. 301-343.
- O'Shea, C.C., L. Johnson, B. Bagus, S. Choi, C. Nicholas, A. Shen, L. Boyle, K. Pandey, C. Soria, J. Kunich, Y. Shen, G. Habets, D. Ginzinger, and F. McCormick. 2004. Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity. *Cancer Cell.* 6:611-623.
- Ornelles, D.A., and T. Shenk. 1991. Localization of the adenovirus early region 1B 55-kilodalton protein during lytic infection: association with nuclear viral inclusions requires the early region 4 34-kilodalton protein. *J. Virol.* 65:424-429.
- Pandolfi, P.P., M. Alcalay, M. Fagioli, D. Zangrilli, A. Mencarelli, D. Diverio, A. Biondi, F. Lo Coco, A. Rambaldi, F. Grignani, and et al. 1992. Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RAR alpha transcripts that encode aberrant PML proteins and PML/RAR alpha isoforms in acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J.* 11:1397-407.
- Paraskeva, C., K.W. Brown, A.R. Dunn, and P.H. Gallimore. 1982. Adenovirus type 12-transformed rat embryo brain and rat liver epithelial cell lines: adenovirus type 12 genome content and viral protein expression. *J. Virol.* 44:759-764.
- Paraskeva, C., and P.H. Gallimore. 1980. Tumorigenicity and in vitro characteristics of rat liver epithelial cells and their adenovirus-transformed derivatives. *Int. J. Cancer.* 25:631-639.
- Pearson, M., R. Carbone, C. Sebastiani, M. Cioce, M. Fagioli, S. Saito, Y. Higashimoto, E. Appella, S. Minucci, P.P. Pandolfi, and P.G. Pelicci. 2000. PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature.* 406:207-10.
- Pfeffer, A., R. Schubert, G. Orend, K. Hilger-Eversheim, and W. Doerfler. 1999. Integrated viral genomes can be lost from adenovirus type 12-induced hamster tumor cells in a clone-specific, multistep process with retention of the oncogenic phenotype. *Virus Res.* 59:113-127.
- Pichler, A., and F. Melchior. 2002. Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmic transport. *Traffic.* 3:381-387.
- Pilder, S., K. Leppard, J. Logan, and T. Shenk. 1986a. Functional analysis of the adenovirus E1B 55K polypeptide. *Cancer Cells.* 4:285-290.
- Pilder, S., M. Moore, J. Logan, and T. Shenk. 1986b. The adenovirus E1B-55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 6:470-476.
- Plehn-Dujowich, D., P. Bell, A.M. Ishov, C. Baumann, and G.G. Maul. 2000. Non-apoptotic chromosome condensation induced by stress: delineation of interchromosomal spaces. *Chromosoma.* 109:266-79.
- Ponten, J., and E. Saksela. 1967. Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours. *Int J Cancer.* 2:434-47.
- Preston, C.M., and M.J. Nicholl. 2006. Role of the cellular protein hDaxx in human cytomegalovirus immediate-early gene expression. *J Gen Virol.* 87:1113-21.
- Punga, T., and G. Akusjärvi. 2000. The adenovirus-2 E1B-55K protein interacts with a mSin3A/histone deacetylase 1 complex. *FEBS Lett.* 476:248-252.
- Puvion-Dutilleul, F., M.K. Chelbi-Alix, M. Koken, F. Quignon, E. Puvion, and H. de The. 1995a. Adenovirus infection induces rearrangements in the intranuclear distribution of the nuclear body-associated PML protein. *Exp. Cell Res.* 218:9-16.
- Puvion-Dutilleul, F., L. Venturini, M.C. Guillemin, H. de The, and E. Puvion. 1995b. Sequestration of PML and Sp100 proteins in an intranuclear viral structure during herpes simplex virus type 1 infection. *Exp Cell Res.* 221:448-61.
- Querido, E., P. Blanchette, Q. Yan, T. Kamura, M. Morrison, D. Boivin, W.G. Kaelin, R.C. Conaway, J.W. Conaway, and P.E. Branton. 2001. Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K

- proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes Dev.* 15:3104-3117.
- Querido, E., R.C. Marcellus, A. Lai, C. Rachel, J.G. Teodoro, G. Ketner, and P.E. Branton. 1997a. Regulation of p53 levels by the E1B 55-kilodalton protein and E4orf6 in adenovirus-infected cells. *J. Virol.* 71:3788-3798.
- Querido, E., J.G. Teodoro, and P.E. Branton. 1997b. Accumulation of p53 induced by the adenovirus E1A protein requires regions involved in the stimulation of DNA synthesis. *J. Virol.* 71:3526-3533.
- Rao, L., M. Debbas, P. Sabbatini, D. Hockenbery, S. Korsmeyer, and E. White. 1992. The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:7742-7746.
- Raoul, C., C. Barthelemy, A. Couzinet, D. Hancock, B. Pettmann, and A.O. Hueber. 2005. Expression of a dominant negative form of Daxx in vivo rescues motoneurons from Fas (CD95)-induced cell death. *J Neurobiol.* 62:178-88.
- Raska, K., Jr., and P.H. Gallimore. 1982. An inverse relation of the oncogenic potential of adenovirus-transformed cells and their sensitivity to killing by syngeneic natural killer cells. *Virology.* 123:8-18.
- Regad, T., C. Bellodi, P. Nicotera, and P. Salomoni. 2009. The tumor suppressor Pml regulates cell fate in the developing neocortex. *Nat Neurosci.* 12:132-40.
- Regad, T., and M.K. Chelbi-Alix. 2001a. Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene.* 20:7274-86.
- Regad, T., A. Saib, V. Lallemand-Breitenbach, P.P. Pandolfi, H. de The, and M.K. Chelbi-Alix. 2001b. PML mediates the interferon-induced antiviral state against a complex retrovirus via its association with the viral transactivator. *EMBO J.* 20:3495-505.
- Reich, N.C., P. Sarnow, E. Duprey, and A.J. Levine. 1983. Monoclonal antibodies which recognize native and denatured forms of the adenovirus DNA-binding protein. *Virology.* 128:480-484.
- Ridgway, P.J., A.R. Hall, C.J. Myers, and A.W. Braithwaite. 1997. p53/E1b58kDa complex regulates adenovirus replication. *Virology.* 237:404-413.
- Ronai, Z. 2006. Balancing Mdm2 - a Daxx-HAUSP matter. *Nat Cell Biol.* 8:790-1.
- Roth, J., C. König, S. Wienzek, S. Weigel, S. Ristea, and M. Dobbelstein. 1998. Inactivation of p53 but not p73 by adenovirus type 5 E1B 55-Kilodalton and E4 34-Kilodalton oncoproteins. *J. Virol.* 72:8510-8516.
- Rowe, W.P., R.J. Huebner, L.K. Gilmore, R.H. Parrot, and T.G. Ward. 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 84:570-573.
- Ruggero, D., Z.G. Wang, and P.P. Pandolfi. 2000. The puzzling multiple lives of PML and its role in the genesis of cancer. *Bioessays.* 22:827-35.
- Ruley, H.E. 1983. Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature.* 304:602-606.
- Russel, W.C. 2000. Update on adenovirus and its vectors. *J. Gen. Virol.* 81:2573-2604.
- Russell, W.C. 2009. Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol.* 90:1-20.
- Russell, W.C., and D.A. Matthews. 2003. Nuclear perturbations following adenovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* 272:399-413.
- Sadowski, I., and M. Ptashne. 1989. A vector for expressing GAL4(1-147) fusions in mammalian cells. *Nucl. Acids Res.* 17:7539.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239:487-91.
- Saitoh, H., R.T. Pu, and M. Dasso. 1997. SUMO-1: wrestling with a new ubiquitin-related modifier. *Trends Biochem Sci.* 22:374-6.
- Salomoni, P., and A.F. Khelifi. 2006. Daxx: death or survival protein? *Trends Cell Biol.* 16:97-104.
- Salomoni, P., and P.P. Pandolfi. 2002. The role of PML in tumor suppression. *Cell.* 108:165-70.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sarnow, P., P. Hearing, C.W. Anderson, D.N. Halbert, T. Shenk, and A.J. Levine. 1984. Adenovirus early region 1B 58,000-dalton tumor antigen is physically associated with an early region 4

- 25,000-dalton protein in productively infected cells. *J. Virol.* 49:692-700.
- Sarnow, P., P. Hearing, C.W. Anderson, N. Reich, and A.J. Levine. 1982a. Identification and characterization of an immunologically conserved adenovirus early region 11,000 Mr protein and its association with the nuclear matrix. *J. Mol. Biol.* 162:565-583.
- Sarnow, P., C.A. Sullivan, and A.J. Levine. 1982b. A monoclonal antibody detecting the adenovirus type 5-E1b-58Kd tumor antigen: characterization of the E1b-58Kd tumor antigen in adenovirus-infected and -transformed cells. *Virology.* 120:510-7.
- Sarnow, P., C.A. Sullivan, and A.J. Levine. 1982c. A monoclonal antibody detecting the adenovirus type 5-E1b-58Kd tumor antigen: characterization of the E1b-58Kd tumor antigen in adenovirus-infected and -transformed cells. *Virology.* 120:510-517.
- Schaeper, U., T. Subramanian, L. Lim, J.M. Boyd, and G. Chinnadurai. 1998. Interaction between a cellular protein that binds to the C-terminal region of adenovirus E1A (CtBP) and a novel cellular protein is disrupted by E1A through a conserved PLDLS motif. *J. Biol. Chem.* 273:8549-8552.
- Schiedner, G., S. Hertel, and S. Kochanek. 2000. Efficient transformation of primary human amniocytes by E1 functions of ad5: generation of new cell lines for adenoviral vector production. *Hum. Gene Ther.* 11:2105-2116.
- Sharma, R.C., and R.T. Schimke. 1996. Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium. *Biotechniques.* 20:42-4.
- Shaw, G., S. Morse, M. Ararat, and F.L. Graham. 2002. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *Faseb J.* 16:869-871.
- Shen, Y., G. Kitzes, J.A. Nye, A. Fattaey, and T. Hermiston. 2001a. Analyses of single-amino-acid substitution mutants of adenovirus type 5 E1B-55K protein. *J. Virol.* 75:4297-307.
- Shen, Y., and E. White. 2001b. p53-dependent apoptosis pathways. *Adv. Cancer Res.* 82:55-84.
- Shenk, T. 2001. Adenoviridae: the viruses and their replication. In *Virology*. Vol. 2. D.M. Knipe and P.M. Howley, editors. Lippincott-Raven, New York. 2265-2300.
- Sieber, T., and T. Dobner. 2007. Adenovirus Type 5 Early Region 1B 156R Protein Promotes Cell Transformation Independently of Repression of p53-Stimulated Transcription. *J. Virol.* 81:95-105.
- Smiley, J.K., M.A. Young, and S.J. Flint. 1990. Intracellular location of the adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton protein. *J. Virol.* 64:4558-4564.
- Song, J.J., and Y.J. Lee. 2004. Tryptophan 621 and serine 667 residues of Daxx regulate its nuclear export during glucose deprivation. *J Biol Chem.* 279:30573-8.
- Steegenga, W.T., N. Riteco, A.G. Jochemsen, F.J. Fallaux, and J.L. Bos. 1998. The large E1B protein together with the E4orf6 protein target p53 for active degradation in adenovirus infected cells. *Oncogene.* 16:349-357.
- Stewart, P.L., S.D. Fuller, and R.M. Burnett. 1993. Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *EMBO J.* 12:2589-99.
- Stracker, T.H., C.T. Carson, and M.D. Weitzman. 2002. Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11 Rad50 NBS1 DNA repair complex. *Nature.* 418:348-352.
- Takahashi, Y., V. Lallemand-Breitenbach, J. Zhu, and H. de The. 2004. PML nuclear bodies and apoptosis. *Oncogene.* 23:2819-24.
- Tang, J., S. Wu, H. Liu, R. Stratt, O.G. Barak, R. Shiekhattar, D.J. Picketts, and X. Yang. 2004. A novel transcription regulatory complex containing death domain-associated protein and the ATR-X syndrome protein. *J Biol Chem.* 279:20369-77.
- Tang, Q., and G.G. Maul. 2003. Mouse cytomegalovirus immediate-early protein 1 binds with host cell repressors to relieve suppressive effects on viral transcription and replication during lytic infection. *J Virol.* 77:1357-67.
- Täuber, B., and T. Dobner. 2001a. Adenovirus early E4 genes in viral oncogenesis. *Oncogene.* 20:7847-7854.
- Täuber, B., and T. Dobner. 2001b. Molecular regulation and biological function of adenovirus early genes: the E4 ORFs. *Gene.* 278:1-23.
- Tavalai, N., P. Papior, S. Rechter, and T. Stamminger. 2008. Nuclear domain 10 components promyelocytic leukemia protein and hDaxx independently contribute to an intrinsic antiviral defense against human cytomegalovirus infection. *J Virol.* 82:126-37.
- Teodoro, J.G., and P.E. Branton. 1997a. Regulation of p53-dependent apoptosis, transcriptional

- repression, and cell transformation by phosphorylation of the 55-kilodalton E1B protein of human adenovirus type 5. *J Virol.* 71:3620-7.
- Teodoro, J.G., and P.E. Branton. 1997b. Regulation of p53-dependent apoptosis, transcriptional repression, and cell transformation by phosphorylation of the 55-kilodalton E1B protein of human adenovirus type 5. *J. Virol.* 71:3620-3627.
- Teodoro, J.G., T. Halliday, S.G. Whalen, D. Takayesu, F.L. Graham, and P.E. Branton. 1994. Phosphorylation at the carboxy terminus of the 55-kilodalton adenovirus type 5 E1B protein regulates transforming activity. *J. Virol.* 68:776-786.
- Teodoro, J.G., G.C. Shore, and P.E. Branton. 1995. Adenovirus E1A proteins induce apoptosis by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene.* 11:467-474.
- Terris, B., V. Baldin, S. Dubois, C. Degott, J.F. Flejou, D. Henin, and A. Dejean. 1995. PML nuclear bodies are general targets for inflammation and cell proliferation. *Cancer Res.* 55:1590-7.
- Thomas, D.L., J. Schaack, H. Vogel, and R.T. Javier. 2001. Several E4 region functions influence mammary tumorigenesis by human adenovirus type 9. *J. Virol.* 75:557-568.
- Trentin, J.J., Y. Yabe, and G. Taylor. 1962. The quest for human cancer viruses: a new approach to an old problem reveals cancer induction in hamster by human adenoviruses. *Science.* 137:835-849.
- Turelli, P., V. Doucas, E. Craig, B. Mangeat, N. Klages, R. Evans, G. Kalpana, and D. Trono. 2001. Cytoplasmic recruitment of INI1 and PML on incoming HIV preintegration complexes: interference with early steps of viral replication. *Mol Cell.* 7:1245-54.
- Ullman, A.J., and P. Hearing. 2008. Cellular proteins PML and Daxx mediate an innate antiviral defense antagonized by the adenovirus E4 ORF3 protein. *J Virol.* 82:7325-35.
- van den Heuvel, S.J.L., S.I. The, B. Klein, A.G. Jochemsen, A. Zantema, and A.J. van der Eb. 1992. p53 shares an antigenic determinant with proteins of 92 and 150 kilodaltons that may be involved in senescence of human cells. *J. Virol.* 66:591-595.
- Vellinga, J., S. Van der Heijdt, and R.C. Hoeben. 2005. The adenovirus capsid: major progress in minor proteins. *J Gen Virol.* 86:1581-8.
- Vojtesek, B., J. Bartek, C.A. Midgley, and D.P. Lane. 1992. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J. Immunol. Methods.* 151:237-244.
- Wadell, G. 1984. Molecular epidemiology of human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 110:191-220.
- Weber, K., U. Bartsch, C. Stocking, and B. Fehse. 2008. A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol Ther.* 16:698-706.
- Weiden, M.D., and H.S. Ginsberg. 1994. Deletion of the E4 region of the genome produces adenovirus DNA concatemers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:153-157.
- Weis, K., S. Rambaud, C. Lavau, J. Jansen, T. Carvalho, M. Carmo-Fonseca, A. Lamond, and A. Dejean. 1994. Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells. *Cell.* 76:345-56.
- White, E. 1995. Regulation of p53-dependent apoptosis by E1A and E1B. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 199:34-58.
- White, E. 1996. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev.* 10:1-15.
- White, E. 1998. Regulation of apoptosis by adenovirus E1A and E1B oncoproteins. *Semin. Virol.* 8:505-513.
- Whittaker, J.L., P.J. Byrd, R.J. Grand, and P.H. Gallimore. 1984. Isolation and characterization of four adenovirus type 12-transformed human embryo kidney cell lines. *Mol. Cell. Biol.* 4:110-116.
- Wickham, T.J., E.J. Filardo, D.A. Cheresch, and G.R. Nemerow. 1994. Integrin alpha v beta 5 selectively promotes adenovirus mediated cell membrane permeabilization. *J Cell Biol.* 127:257-64.
- Wickham, T.J., P. Mathias, D.A. Cheresch, and G.R. Nemerow. 1993. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell.* 73:309-19.
- Wiethoff, C.M., H. Wodrich, L. Gerace, and G.R. Nemerow. 2005. Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *J Virol.* 79:1992-2000.
- Williams, J., B.D. Karger, Y.S. Ho, C.L. Castiglia, T. Mann, and S.J. Flint. 1986. The adenovirus E1B 495R protein plays a role in regulating the transport and stability of the viral late messages. *Cancer Cells.* 4:275-284.
- Williams, J., M. Williams, C. Liu, and G. Telling. 1995. Assessing the role of E1A in the differential oncogenicity of group A and group C human adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*

- 199:149-175.
- Wilson, V.G., and D. Rangasamy. 2001. Intracellular targeting of proteins by sumoylation. *Exp. Cell Res.* 271:57-65.
- Wodrich, H., A. Cassany, M.A. D'Angelo, T. Guan, G. Nemerow, and L. Gerace. 2006. Adenovirus core protein pVII is translocated into the nucleus by multiple import receptor pathways. *J Virol.* 80:9608-18.
- Wodrich, H., T. Guan, G. Cingolani, D. Von Seggern, G. Nemerow, and L. Gerace. 2003. Switch from capsid protein import to adenovirus assembly by cleavage of nuclear transport signals. *Embo J.* 22:6245-55.
- Woodhall, D.L., I.J. Groves, M.B. Reeves, G. Wilkinson, and J.H. Sinclair. 2006. Human Daxx-mediated repression of human cytomegalovirus gene expression correlates with a repressive chromatin structure around the major immediate early promoter. *J Biol Chem.* 281:37652-60.
- Xi, Q., R. Cuesta, and R.J. Schneider. 2004. Tethering of eIF4G to adenoviral mRNAs by viral 100k protein drives ribosome shunting. *Genes Dev.* 18:1997-2009.
- Xi, Q., R. Cuesta, and R.J. Schneider. 2005. Regulation of translation by ribosome shunting through phosphotyrosine-dependent coupling of adenovirus protein 100k to viral mRNAs. *J Virol.* 79:5676-83.
- Xue, Y., R. Gibbons, Z. Yan, D. Yang, T.L. McDowell, S. Sechi, J. Qin, S. Zhou, D. Higgs, and W. Wang. 2003. The ATRX syndrome protein forms a chromatin-remodeling complex with Daxx and localizes in promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:10635-40.
- Yang, X., R. Khosravi-Far, H.Y. Chang, and D. Baltimore. 1997. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell.* 89:1067-76.
- Yew, P.R., and A.J. Berk. 1992a. Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature.* 357:82-85.
- Yew, P.R., and A.J. Berk. 1992b. Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature.* 357:82-5.
- Yew, P.R., C.C. Kao, and A.J. Berk. 1990. Dissection of functional domains in the adenovirus 2 early 1B 55K polypeptide by suppressor-linker insertional mutagenesis. *Virology.* 179:795-805.
- Yew, P.R., X. Liu, and A.J. Berk. 1994a. Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. *Genes Dev.* 8:190-202.
- Yew, P.R., X. Liu, and A.J. Berk. 1994b. Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. *Genes Dev.* 8:190-202.
- Zantema, A., J.A. Fransen, O.A. Davis, F.C. Ramaekers, G.P. Vooijs, B. DeLeys, and A.J. van der Eb. 1985a. Localization of the E1B proteins of adenovirus 5 in transformed cells, as revealed by interaction with monoclonal antibodies. *Virology.* 142:44-58.
- Zantema, A., P.I. Schrier, O.A. Davis, T. van Laar, R.T. Vaessen, and A.J. van der Eb. 1985b. Adenovirus serotype determines association and localization of the large E1B tumor antigen with cellular tumor antigen p53 in transformed cells. *Mol. Cell. Biol.* 5:3084-3091.
- Zeller, T., K. Kindsmüller, P. Groitl, and T. Dobner. 2003. Nucleocytoplasmic shuttling of the adenovirus type 5 E1B-55kDa Protein in productively infected cells. *J. Virol.* Zur Veröffentlichung eingereicht.
- Zerler, B., B. Moran, K. Maruyama, J. Moomaw, T. Grodzicker, and H.E. Ruley. 1986. Adenovirus E1A coding sequences that enable ras and pmt oncogenes to transform cultured primary cells. *Mol. Cell. Biol.* 6:887-899.
- Zhang, Y., D. Feigenbaum, and R.J. Schneider. 1994. A late adenovirus factor induces eIF-4E dephosphorylation and inhibition of cell protein synthesis. *J. Virol.* 68:7040-7050.
- Zhao, L.Y., A.L. Colosimo, Y. Liu, Y. Wan, and D. Liao. 2003. Adenovirus E1B 55-kilodalton oncoprotein binds to Daxx and eliminates enhancement of p53-dependent transcription by Daxx. *J. Virol.* 77:11809-11821.
- Zhong, S., S. Muller, S. Ronchetti, P.S. Freemont, A. Dejean, and P.P. Pandolfi. 2000a. Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood.* 95:2748-2752.
- Zhong, S., S. Muller, S. Ronchetti, P.S. Freemont, A. Dejean, and P.P. Pandolfi. 2000b. Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood.* 95:2748-52.
- Zhong, S., P. Salomoni, and P.P. Pandolfi. 2000c. The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat Cell Biol.* 2:E85-90.
- Zhong, S., P. Salomoni, S. Ronchetti, A. Guo, D. Ruggero, and P.P. Pandolfi. 2000d. Promyelocytic

LITERATURVERZEICHNIS

- leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis. *J Exp Med.* 191:631-40.
- Zhu, W.G., J.D. Seno, B.D. Beck, and J.R. Dynlacht. 2001. Translocation of MRE11 from the nucleus to the cytoplasm as a mechanism of radiosensitization by heat. *Radiat. Res.* 156:95-102.

Veröffentlichungen

Publikationen in Fachzeitschriften

Kindsmüller, K., S. Schreiner, et al. (2009). "A 49-kilodalton isoform of the adenovirus type 5 early region 1B 55-kilodalton protein is sufficient to support virus replication." *J Virol* **83**(18): 9045-56.

Schreiner S., P. Wimmer, et al. (2009). "Daxx-mediated negative regulation of adenovirus replication is counteracted by viral Ad5 E1B-55K-Protein." Manuskript in Vorbereitung.

Wimmer P., S. Schreiner, et al. (2009). "Ad5 E1B-55K and E4orf6 interact specifically with distinct isoforms of the cellular tumor suppressor protein PML." Manuskript in Vorbereitung.

Vorträge auf Fachtagungen

Schreiner S., P. Wimmer, et al. "A viral E3-Ubiquitinligase is required for efficient adenovirus replication."

Annual Retreat Virus-Host Interaction, Heinrich-Pette Institut, Hamburg, 07. Dezember 2007.

Schreiner S., P. Wimmer, et al. "Daxx-mediated negative regulation of adenovirus replication is counteracted by viral Ad5 E1B-55K-Protein."

Adenovirus Workshop, Hamburg, 11-13. Februar 2009.

Kindsmüller, K., S. Schreiner, et al. "A 49-kilodalton isoform of the adenovirus type 5 early region 1B 55-kilodalton protein is sufficient to support virus replication."

International Adenovirus Meeting, Budapest, 27-30. April 2009.

Schreiner S., P. Wimmer, et al. "Daxx-mediated negative regulation of adenovirus replication is counteracted by viral Ad5 E1B-55K-Protein."

Annual Laboratory Retreat, Biochemical Department Mc Gill University, Montreal/Kanada,, 26-29. November 2009.

Posterpräsentationen bei Fachtagungen

Kindsmüller, K., S. Schreiner, et al. "A 49-kilodalton isoform of the adenovirus type 5 early region 1B 55-kilodalton protein is sufficient to support virus replication."

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Erlangen, 01.-05. September 2007.

Schreiner S., P. Wimmer, et al. "Daxx-mediated negative regulation of adenovirus replication is counteracted by viral Ad5 E1B-55K-Protein."

Small DNA Tumor Viruses Meeting, Oxford, 14.-19. Juli 2002.

Teilnahme an Fachtagungen

GBM Tagung für Molecular Life Sciences; September 2007, Hamburg.

GfV Tagung (Tagung der deutschen Virologen); März 2009, Leipzig.

*Workshop zur Förderung von Nachwuchswissenschaftlern/Antragstellung im
7. EU-Forschungsrahmenprogramm, 06.Mai 2009, Berlin.*

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Dobner für die die Betreuung meiner Doktorarbeit sowie für die besondere Möglichkeit mit ihm nach Hamburg zu kommen. Seine tatkräftige Unterstützung und sein Engagement haben sehr zum Gelingen beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Joachim Hauber danke ich vielmals für die Bereitschaft, das Zweitgutachten zu erstellen.

Ich möchte mich auch bei Herrn Prof. Dr. Hans Will und Herrn Prof. Dr. Günter Adam für die Übernahme des Disputationsgutachtens, bei Herrn Prof. Dr. Michael Böttger für den Vorsitz der Prüfungskommission und bei den Fragestellern bedanken.

Vielen herzlichen Dank an dich Peter, dafür dass du mich in jeder Hinsicht unterstützt hast, diese Arbeit zu einem vernünftigen Ende zu bringen. Dankeschön für deine Motivation und deine Ratschläge, die ich in vielen Momenten echt nötig hatte. Ich möchte mich auch für die unzähligen Diskussionen und die daraus resultierende tolle Zusammenarbeit bedanken und hoffe natürlich dass das auch noch lange so bleibt.

Bei Barbara und Kathrin möchte ich mich für das Korrekturlesen und noch viel mehr für unsere jahrelange Freundschaft bedanken. Dankeschön für die schöne Zeit in der Mädls-WG und für die Hilfsbereitschaft bei der Lösung verschiedenster Problemchen.

Danken möchte ich auch Tom für das Korrekturlesen und die schöne Zeit im Dungeon. Vielen Dank für deine Unterstützung auch außerhalb des Labors!

Weiter möchte ich Peter „Klonatore“ Groitl für die Hilfsbereitschaft bei allen „unschönen“ Klonierungen, ohne die diese Arbeit nicht hätte durchgeführt werden können, meinen Dank aussprechen.

Weiterhin möchte ich mich bei der ganzen Arbeitsgruppe bedanken und vor allem bei denen, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben.

Beim HPI bedanke ich mich für die Bereitstellung des Mobilitätsstipendiums. Bei Paola und Phil möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, in ihrem Labor drei Monate zu forschen, sowie für die

DANKSAGUNG

Einladung zum Lab Retreat nach Montreal.

Dankeschön auch an Harry Wodrich für die Bereitstellung von Reagenzien und für seine Unterstützung bei vielen fachlichen Fragestellungen.

Bei Hüseyin Sirma und Roger Everett möchte ich mich für die Bereitstellung vieler Zelllinien und Reagenzien bedanken.

Ich bedanke mich auch bei meinen zwei Oma's die in jeder Situation für mich da sind.

Ein ganz besonderer Dank richtet sich von ganzem Herzen an meine Eltern, meine Schwester Tamara und meinen Bruder Tobias auf die ich mich unabhängig von allen Höhen und Tiefen verlassen kann und ohne deren Unterstützung und Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.