



Genetische und biochemische Analysen zur Funktion  
des viralen Proteins E4orf3/4 im lytischen  
Replikationszyklus vom humanen 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  
**Thomas Speiseder**  
aus Bogen

August 2010

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Professor Dr. T. DOBNER  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Professor Dr. J. HAUBER  
Tag der Disputation: 06. August 2010

Hamburg, den 21. Juli 2010



*A. Temming*  
Professor Dr. Axel Temming  
Leiter des Departments Biologie

# Inhaltsverzeichnis

---

---

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>V</b>
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2 EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Adenoviren</b>	<b>3</b>
2.1.1 Klassifikation	3
2.1.2 Struktur und Genomorganisation humaner Adenoviren	4
2.1.3 Produktiver Infektionszyklus humaner Adenoviren	6
<b>2.2 Die Rolle der E4-Region in der lytischen Infektion</b>	<b>8</b>
2.2.1 E4orf3	9
2.2.2 E4orf4	10
2.2.3 E4orf3/4	11
2.2.4 E4orf6	12
2.2.5 E4orf6/7	13
<b>2.3 Transformation und Onkogenität humaner Adenoviren</b>	<b>14</b>
2.3.1 Onkogenes Potenzial humaner Adenoviren	14
2.3.2 Transformation von Nagerzellen in Kultur	15
2.3.3 Transformation humaner Zellen in Kultur	16
2.3.4 Persistenz und DNA-Integration	16
2.3.5 Struktur und Funktion adenoviraler Onkoproteine	17
2.3.5.1 E1-Region und die klassische Transformation	17
2.3.5.2 E4-Genprodukte in der Transformation	18
<b>2.4 Adenoviren in der Gentherapie</b>	<b>20</b>
<b>2.5 Zielsetzung und Aufgabenstellung</b>	<b>22</b>

<b>3</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellen</b>	<b>23</b>
3.1.1	Bakterienstämme	23
3.1.2	Hefestämme	23
3.1.3	Säugerzelllinien	23
<b>3.2</b>	<b>Adenoviren</b>	<b>24</b>
<b>3.3</b>	<b>Nukleinsäuren</b>	<b>25</b>
3.3.1	Oligonukleotide	25
3.3.2	Expressionsvektoren	26
3.3.3	Rekombinante Plasmide	27
3.3.4	E4-Box Plasmide	28
3.3.5	Bacmide	29
<b>3.4</b>	<b>Antikörper</b>	<b>30</b>
3.4.1	Primärantikörper	30
3.4.2	Sekundärantikörper	31
<b>3.5</b>	<b>Kommerzielle Systeme</b>	<b>32</b>
<b>3.6</b>	<b>Enzyme, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien</b>	<b>33</b>
<b>3.7</b>	<b>Größen- und Molekulargewichtstandards</b>	<b>33</b>
<b>3.8</b>	<b>Versuchstiere</b>	<b>33</b>
<b>3.9</b>	<b>Software und Datenbanken</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>METHODEN</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Bakterien</b>	<b>35</b>
4.1.1	Kulturbedingungen und Lagerung	35
4.1.2	Transformation von <i>E. coli</i>	36
4.1.2.1	Elektroporationsmethode	36
4.1.2.2	Chemische Transformation von <i>E. coli</i>	36
<b>4.2</b>	<b>Säugerzellen</b>	<b>37</b>
4.2.1	Kultivierung und Lagerung von etablierten Säugerzellen	37
4.2.2	Gewinnung und Kultivierung primärer Rattennierenzellen	38

4.2.3	Lagerung von Säugerzellen	39
4.2.4	Transfektion/Transduktion von Säugerzellen	39
4.2.4.1	Auf Polyethylenimin (PEI-) basierende Methode	39
4.2.4.2	Auf Liposomen basierende Methode	40
4.2.4.3	Auf Lentiviren basierende Methode	40
4.2.4.3.1	Herstellung rekombinanter Lentiviruspartikel	40
4.2.4.3.2	Titerbestimmung rekombinanter Lentiviruspartikel	41
4.2.4.3.3	Infektion von Säugerzellen mit lentiviralen Partikeln	42
4.2.5	Ernte von Säugerzellen	42
4.2.6	Transformation primärer Nagerzellen mit Ad-Genprodukten	42
<b>4.3</b>	<b>Hefe-Zwei-Hybrid-System</b>	<b>43</b>
4.3.1	Transformation von Hefezellen	44
4.3.2	$\beta$ -Galaktosidase <i>Filter-Lift Assay</i>	47
4.3.3	<i>Screening</i> einer B-Zell cDNA Bibliothek	48
4.3.4	Plasmid-DNA-Präparation aus Hefezellen	49
<b>4.4</b>	<b>Adenoviren</b>	<b>49</b>
4.4.1	Herstellung von Viruspartikeln aus DNA	49
4.4.2	Herstellung und Lagerung hochtitriger Virusstocks	50
4.4.3	Reinigung und Konzentrierung von Viruspartikeln mit Hilfe der CsCl-Dichtegradientenzentrifugation	50
4.4.4	Titerbestimmung von Virusstocks	51
4.4.5	Infektion von Säugerzellen mit Adenoviren	52
4.4.6	Bestimmung und Ausbeute an Virusnachkommen	53
4.4.7	Inhibition zellulärer 26S Proteasomen	53
<b>4.5</b>	<b>DNA-Techniken</b>	<b>54</b>
4.5.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	54
4.5.2	Extraktion viraler DNA aus Viruspartikeln	55
4.5.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	55
4.5.4	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	56
4.5.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	56
4.5.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	57
4.5.6.1	Standard-PCR	57
4.5.6.2	Zielgerichtete <i>in vitro</i> Mutagenese mittels PCR	57
4.5.6.3	PCR zum Nachweis der Virusreplikation	58
4.5.7	Klonierung von DNA-Fragmenten	59

# INHALTSVERZEICHNIS

---

4.5.7.1	Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme	59
4.5.7.2	Ligation und Transformation	59
4.5.7.3	Identifizierung rekombinanter Klone	59
4.5.7.4	DNA-Sequenzierung	60
<b>4.6</b>	<b>RNA-Techniken</b>	<b>60</b>
4.6.1	Präparation von RNA aus Säugerzellen & cDNA-Synthese	60
<b>4.7</b>	<b>Protein-Techniken</b>	<b>61</b>
4.7.1	Herstellung von Gesamtzellextrakt aus Säugerzellen	61
4.7.2	Quantitative Bestimmung von Proteinkonzentrationen	62
4.7.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	62
4.7.4	<i>Western Blot</i> -Analyseverfahren	64
4.7.5	Nachweis von Protein-Protein Interaktionen mittels Immunpräzipitation	65
4.7.6	Immunfluoreszenz-Analysen	67
4.7.6.1	Fixierung mit Methanol	67
4.7.6.2	Immunologischer Nachweis	67
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>68</b>
<b>5.1</b>	<b>Expression von E4orf3/4 in transient transfizierten Säugerzellen</b>	<b>68</b>
5.1.1	Subzelluläre Lokalisation von E4orf3/4	68
5.1.2	Immunhistochemischer Nachweis des E4orf3/4-Proteins mittels <i>Western Blot</i> Analysen	70
5.1.3	Analysen zur Halbwertszeit von E4orf3/4	71
<b>5.2</b>	<b>Untersuchungen zum transformierenden Potenzial von E4orf3/4</b>	<b>73</b>
<b>5.3</b>	<b>Identifizierung von PCNA als Interaktor von E4orf3/4 im Hefe-Zwei-Hybridsystem</b>	<b>77</b>
<b>5.4</b>	<b>Analysen zur Interaktion von E4orf3/4 und E4orf4 mit PCNA</b>	<b>79</b>
5.4.1	PCNA bindet an E4orf4 in transient transfizierten und Ad5-infizierten H1299-Zellen	79
<b>5.5</b>	<b>Herstellung von Ad5 E4 Null-Virusmutanten</b>	<b>83</b>
<b>5.6</b>	<b>Charakterisierung der Ad5 E4-Virusmutanten</b>	<b>90</b>
5.6.1	Nachweis der E4orf3/4 mRNA	90
5.6.2	Analysen der E4-Nullmutationen auf Proteinebene	95
5.6.2.1	<i>Western Blot</i> Analysen früher Proteine	95
5.6.2.2	<i>Western Blot</i> Analysen später Proteine	98
5.6.3	Abbau von p53 und Mre11	100

## INHALTSVERZEICHNIS

---

5.6.4	Analyse der DNA-Replikation	101
5.6.5	Untersuchung der Produktion von Nachkommenviren	103
<b>5.7</b>	<b>Nachweis von E4orf3/4</b>	<b>104</b>
5.7.1	Herstellung von FLAG-fusionierten Ad5 E4-Virusmutanten	104
5.7.2	Fluoreszenzlichtmikroskopie	107
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>113</b>
6.1	Die E4orf3/4-mRNA wird in humanen Ad5-infizierten Zellen synthetisiert	113
6.2	E4orf3/4 zeigt eine streng zytoplasmatische Lokalisation	115
6.3	E4orf3/4 hat eine kurze Halbwertszeit	116
6.4	Transformationsförderndes Potenzial von E4orf3/4	117
6.5	Interaktion von PCNA mit E4orf3/4	121
6.6	Herstellung und Analyse von Ad5 E4-Nullmutanten	123
6.6.1	Einfluss der E4-Nullmutationen auf die virale Proteinexpression	124
6.6.2	Einfluss von E4orf3/4 auf die virale DNA-Replikation	126
6.6.3	Funktionen von E4orf3/4 bei der Produktion von Nachkommenviren	127
6.7	Nachweis von E4orf3/4	128
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>131</b>
	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	<b>151</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>152</b>

# Abkürzungen

---

---

Ad	Adenovirus
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
bid.	bidest
Bp	Basenpaare
BRK	Rattennierenzellen ( <i>baby rat kidney cells</i> )
Cap	<i>cap-site</i> (Anheftungsstelle für die 5'-Cap-Struktur)
CHX	Cycloheximid
CR 1, 2, 3	Konservierte Region 1, 2, 3 in E1A ( <i>conserved region</i> )
CRM1	<i>chromosome region maintenance</i>
DAPI	4', 6'-Diamidin-2-phenylindol Dihydrochlorid
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	Ethylendiamintetraacetat
EtOH <sub>75%</sub>	75% (v/v) Ethanol in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
ffu	Fluoreszenz-bildende Einheiten ( <i>fluorescence forming units</i> )
FLAG	FLAG-Epitop
FKS	fötale Kälberserum
fw	<i>forward</i>
HA	Hämagglutinin Epitop des Influenza-Virus
HAdV	humanes Adenovirus
h p.i.	Stunden nach Infektionsbeginn ( <i>hours post infection</i> )
h p.t.	Stunden nach Infektionsbeginn ( <i>hours post transfection</i> )
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IB	Immunblot
Ig	Immunglobulin
IgH	schwere Antikörperkette
IgL	leichte Antikörperkette
IP	Immunpräzipitation
ITR	<i>inverted terminal repeat</i>
kb	Kilobase ( <i>kilo base</i> )
kBp	Kilobasenpaar
K	Kilodalton bei Proteinbezeichnung (z. B. E1B-55K)
kDa	Kilodalton
L1, 2, 3, 4, 5	späte Region 1, 2, 3, 4, 5 ( <i>late region</i> )

## ABKÜRZUNGEN

---

LB	Luria Bertani-Medium
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MHC	<i>major histo compatibility complex</i>
MLTU	<i>major late transcription unit</i>
MLP	<i>major late promoter</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mock	vortäuschen (hier: Scheininfektion/-transfektion)
moi	Multiplizität der Infektion ( <i>multiplicity of infection</i> )
ND10	<i>Nuclear domain 10</i>
NES	nukleäres Exportsignal ( <i>nuclear export signal</i> )
nt	Nukleotid ( <i>nucleotide</i> )
OD	optische Dichte
orf	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline ( <i>phosphate buffered saline</i> )
pBRK	Primäre Rattennierenzellen ( <i>primary baby rat kidney cells</i> )
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i> (zelluläres Protein)
PEI	Polyethylenimin
PML	Protein der promyelozytischen Leukämie
PML-NB	PML <i>nuclear body</i>
POD	PML <i>oncogenic domain</i>
Poly (A)	Polyadenylierungsstelle
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> )
SUMO-1	<i>small ubiquitin-related modifier-1</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TPL	<i>tripartite leader</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i> (Aktivitätseinheit von Enzymen)
Ubi	Ubiquitin
UpM	Umdrehungen pro Minute
VA RNAs	<i>virus-associated RNAs</i>
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

---

---

Die frühe Transkriptionseinheit 4 (E4) humaner Adenoviren kodiert für mindestens sechs verschiedene Polypeptide, die entsprechend der Reihenfolge und Anordnung ihrer offenen Leserahmen (*open reading frame*, orf), als E4orf1, E4orf2, E4orf3, E4orf4, E4orf6 und E4orf6/7 bezeichnet werden. Außerdem wird die Existenz eines weiteren Genproduktes (E4orf3/4) vermutet, da in Adenovirus-infizierten Zellen ein alternativ prozessiertes Fusionstranskript der offenen Leserahmen 3 und 4 (orf3/4) nachgewiesen werden kann. Der abgeleitete Leserahmen von 3/4 kodiert für ein 61 Aminosäurereste (AS) langes Polypeptid, das ein theoretisches Molekulargewicht von 7,2 kDa besitzt und sich aus amino- und carboxyterminalen Bereichen der E4orf3- (33 AS) bzw. E4orf4-Proteine (28 AS) zusammensetzt. Es wird diskutiert, dass E4orf3/4 aufgrund dieser Gemeinsamkeiten redundante Funktionen mit beiden E4-Proteinen besitzt.

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit Untersuchungen zur Expression des E4orf3/4-Gens. Primäres Ziel dieser Analysen war es, das E4orf3/4-Protein in Adenovirus-infizierten Zellen nachzuweisen und seine Rolle im lytischen Infektionszyklus aufzuklären. Mit Hilfe genetischer und biochemischer Analysen konnte erstmals die Existenz des Fusionsproteins E4orf3/4 in virusinfizierten Zellen bestätigt werden. E4orf3/4 ist ein zytoplasmatisches Protein, das in *Western Blot*-Analysen entsprechend seinem theoretischen Molekulargewicht bei ca. 7 kDa nachgewiesen werden kann. Das virale Protein besitzt eine extrem kurze Halbwertszeit (ca. 14 min), was auf wichtige regulatorische Funktionen im viralen Replikationszyklus hinweist. In Übereinstimmung dazu zeigen genetische Analysen verschiedener E4-Virusmutanten (E4orf3-, E4orf4-, E4orf3/4-, E4orf3-4- und E4orf3-4-3/4-), dass E4orf3/4 eine zentrale Rolle beim Übergang von der frühen in die späte Phase der Virusreplikation spielt. Wahrscheinlich reguliert das virale E4-Protein diese Vorgänge über eine intrinsische nukleozytoplasmatische Pendelfunktion und über die Wechselwirkung mit zellulären Faktoren der DNA-Synthese. An erster Stelle steht dabei das zelluläre Protein PCNA, das im Rahmen einer Interaktionssuche mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybridsystems als Bindungspartner identifiziert werden konnte. PCNA ist ein Prozessivitätsfaktor für diverse zelluläre DNA-Polymerasen und ist auch an Vorgängen der DNA-Schadensantwort der Wirtszelle beteiligt.

Analog zu E4orf3 besitzt E4orf3/4 onkogene Eigenschaften, da das virale Protein in Kooperation mit den E1A-Onkoproteinen die Transformation primärer Rattenepithelzellen einleiten und in Kombination mit E1A plus E1B die Effizienz der Transformationsinitiation deutlich steigern kann. Ob diese Aktivitäten über die nukleo-zytoplasmatische Pendelfunktion und/oder Wechselwirkung mit PCNA vermittelt werden müssen weitere Untersuchungen klären.

Insgesamt bestätigen die vorliegenden Ergebnisse erstmals, dass die E4-Region humaner Adenoviren ein Fusionsprotein der offenen Leserahmen 3 und 4 kodiert. E4orf3/4 ist ein regulatorisches Polypeptid das eine wichtige Rolle in der Steuerung des viralen Replikationszyklus spielt. Zusammen mit E4orf3 und E4orf6 ist E4orf3/4 das dritte Protein der E4-Region, das in die Vorgänge der DNA-Synthese und DNA-Reparatur eingreift und onkogene Eigenschaften besitzt. Diesen Aktivitäten liegen offenbar neue molekulare Wirkmechanismen zugrunde, die vermutlich eng mit der Wechselwirkung mit PCNA verknüpft sind.

## 2 Einleitung

---

### 2.1 Adenoviren

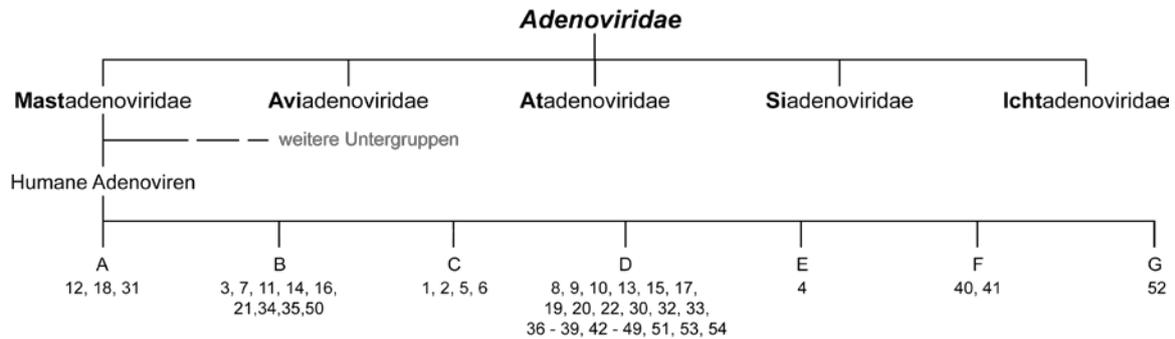
#### 2.1.1 Klassifikation

Adenoviren, aus der Familie der *Adenoviridae*, wurden erstmals 1953 aus adenoidem Gewebe und dem Rachensekret respiratorisch erkrankter Personen isoliert und charakterisiert (Rowe *et al.*, 1953; Hilleman und Werner, 1954). Die ersten Virusisolate wurden zunächst nach ihren Krankheitsbildern als *adenoid degeneration* (AD), *respiratory illness* (RI), *adenoidal-pharyngeal-conjunctival* (APC) oder *acute respiratory disease* (ARD) bezeichnet, aufgrund gemeinsamer Merkmale und Eigenschaften (Huebner *et al.*, 1954) wurden sie 1956 zur Gruppe der Adenoviren zusammengefasst (Enders *et al.*, 1956).

Die *Adenoviridae* umfassen derzeit über 130 verschiedene, serologisch unterscheidbare Virustypen (Doerr, 2009), die Vertebraten vom Fisch bis hin zum Menschen (Benkö *et al.*, 1999) infizieren. Aufgrund ihres breiten Wirtsspektrums werden sie in fünf Gattungen (Genera) eingeteilt (Abb. 1). Diese unterteilen sich in Aviadenoviren die Vögel infizieren, während Mastadenoviren nur Säuger infizieren können. Die Atadenoviren, deren Name auf den erhöhten Adenin- und Thymidin-Gehalt der viralen DNA zurückzuführen ist (Benkö und Harrach, 1998) infizieren Reptilien, Säuger und Vögel, dagegen kommen die Siadenoviren nur in Amphibien und Vögeln vor (Davison *et al.*, 1993). Nach der Entdeckung eines spezifischen Adenovirustyps im Stör, wurde die Gattung der Ichtadenoviren (Adenoviren der Fische) (Benko *et al.*, 2002) eingeführt.

Humanpathogene Adenoviren werden hinsichtlich ihrer Eigenschaften zur Hämagglutination mit bestimmten humanen Seren (Wadell, 1984; Bailey und Mautner, 1994), dem onkogenen Potenzial in immunsupprimierten Versuchstieren sowie der adenoviralen DNA Sequenz (GC-Gehalt, Sequenzhomologien) unterschieden.

Aktuell sind 54 verschiedene humane Typen der Mastadenoviren (HAdV-1 bis 54) bekannt, welche in sieben Subgruppen A - G unterteilt werden (Abb. 1; Davison *et al.*, 2003).



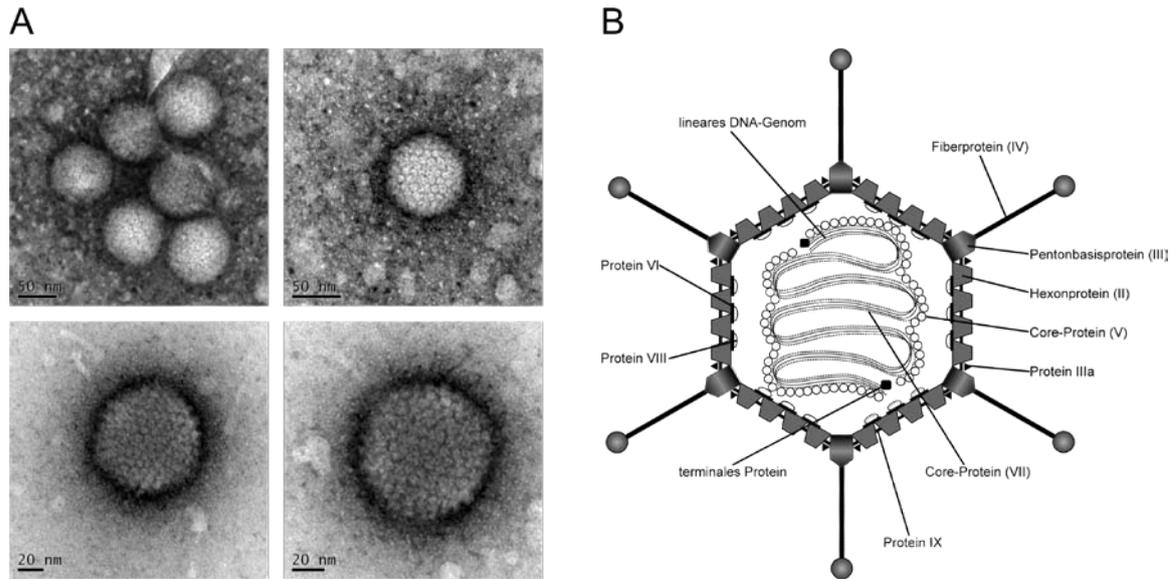
**Abb. 1 Klassifikation humaner Adenoviren**

Schematische Darstellung der Familie der *Adenoviridae*. Die Typen 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).

Humane Adenoviren sind weltweit mit hoher Prävalenz verbreitet, verursachen sowohl lytische als auch persistierende Infektionen und sind mit diversen klinischen Symptomen assoziiert. Die Krankheitsbilder umfassen 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). Kürzlich konnte auch adenovirale DNA der Subgruppen A und D in humanen, pädiatrischen Gehirntumoren nachgewiesen werden, wodurch die adenovirale Pathogenese erstmals mit humanen Tumoren in Verbindung gebracht wird (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

Adenoviren bestehen aus einem 80 - 110 nm großen ikosaedrischen Proteincapsid ohne Membranhülle und enthalten ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom mit einer Länge von 26 - 45 kBp, das in 100 Kartierungseinheiten (mu, *map units*) unterteilt wird (1 mu = 360 nt; Shenk, 2001). An den Enden des adenoviralen Genoms befinden sich invertierte terminale Sequenzwiederholungen (ITR; *inverted terminal repeats*) zwischen 36 - 200 Bp Länge. Das 5'-terminale Ende ist mit dem viralen Terminale Protein (TP) assoziiert, welches zur Initiation der viralen Replikation benötigt wird (Davison *et al.*, 2003).

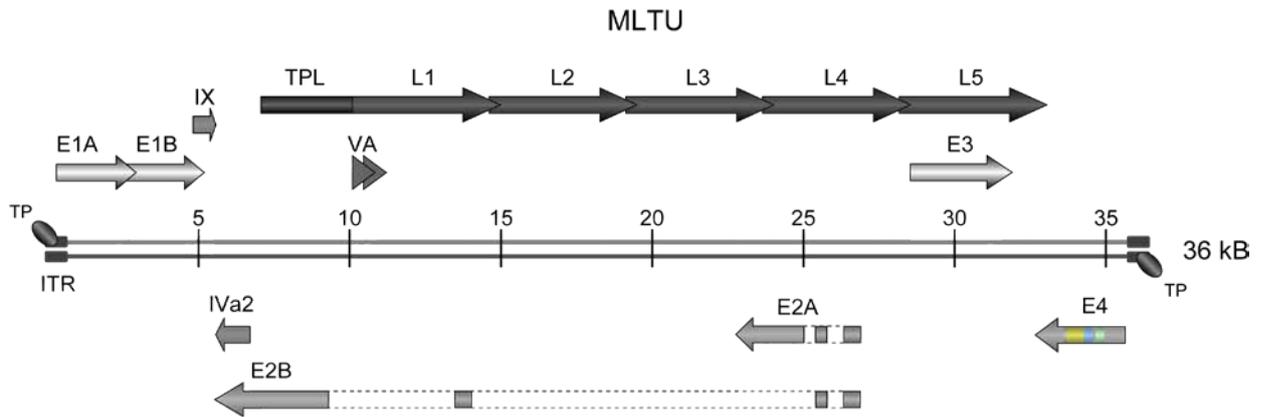


**Abb. 2 Schematische Darstellung eines Adenovirus**

(A) Gezeigt ist 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 Adenoviruspartikel (abgewandelt nach: Modrow und Falke, 2002).

Das adenovirale Capsid besteht aus 252 Untereinheiten, den Capsomeren, welche sich aus 240 Hexonen und 12 Pentonen zusammensetzen (Abb. 2; Modrow und Falke, 2002), wobei beide mit weiteren Strukturproteinen assoziiert sind. Durch Interaktionen mit Capsid-Proteinen ist im Innern des Partikels das sogenannte *core* positioniert. Es besteht aus einem linearen doppelsträngigen DNA-Molekül, das mit Virusproteinen einen sogenannten Nukleoproteinkomplex bildet. Bei den 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 und Matthews, 2003; Russell, 2009). Die eckständigen Pentone sind nicht-kovalent mit Fiberproteinen verknüpft und bilden ein charakteristisches Merkmal der Adenoviruscapside. Diese antennenartigen Fortsätze (*Fiber*), die jeweils aus den 12 Ecken des Ikosaeders herausragen, weisen an ihren Enden eine globuläre Struktur auf (*knob*). Diese sind für die Adsorption des Virus an den Rezeptor der Wirtszelle notwendig (Abb. 2; Bergelson *et al.*, 1997). Bergelson und Mitarbeiter konnten 1997 den Rezeptor, den sogenannten CAR (Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptor) identifizieren, der bei Ad2 und Ad5 für die Adsorption benötigt wird (Bergelson *et al.*, 1997). Zur Aufnahme des Virus in die Zellen über Rezeptor-vermittelte Endozytose spielt das Pentonbasisprotein eine wichtige Rolle, welches den Kontakt zu den Integrinen der Wirtszelloberfläche herstellt (Wickham *et al.*, 1993; Mathias *et al.*, 1994; Wickham *et al.*, 1994).

Bis heute sind die beiden nah miteinander verwandten Adenovirustypen 2 und 5 (Ad2, Ad5) der Subgruppe C am ausführlichsten untersucht. Das in Abb. 3 dargestellte Genom von Ad5 enthält neun Transkriptionseinheiten, die für bis zu 40 verschiedene regulatorische und strukturelle Proteine sowie zwei RNAs (*virus-associated* RNAs, VA RNAs) kodieren (Abb. 3).



**Abb. 3 Die Genomorganisation von Adenovirus Typ 5**

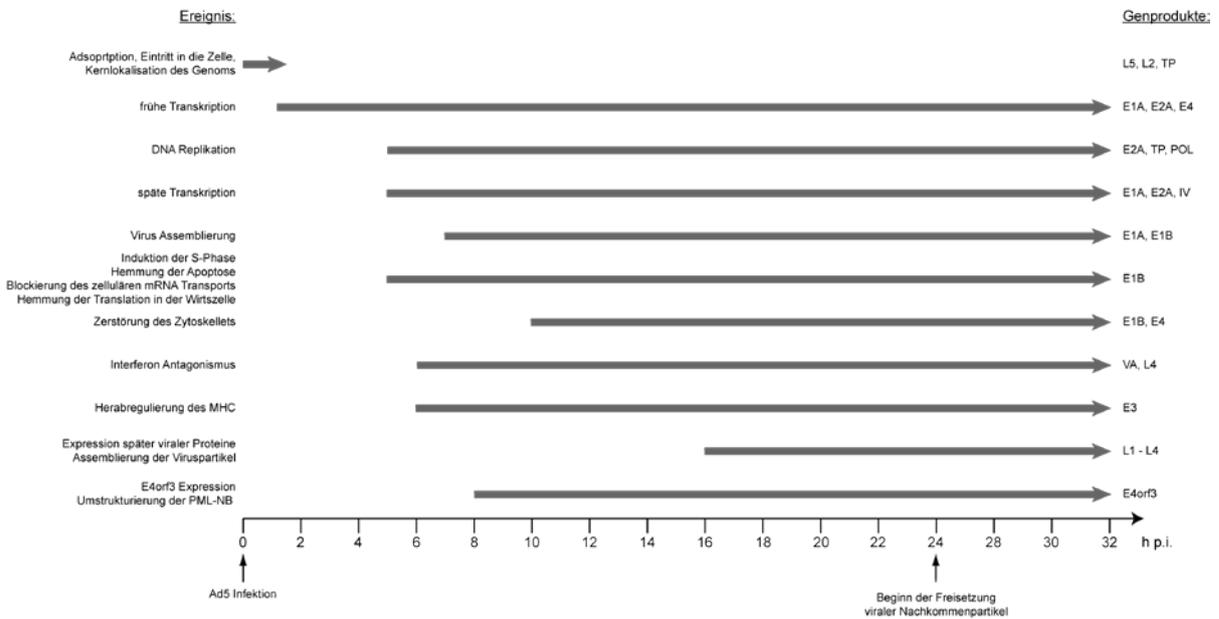
Dargestellt ist die Lage der frühen Gene (E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, pIX und IVa2) und der späten Transkriptionseinheit (MLTU). Die Pfeilrichtung gibt die Transkriptionsrichtung auf den beiden kodierenden DNA-Strängen des viralen Genoms an. Die späten Gene (L1 bis L5) werden erst nach dem Einsetzen 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 viralen 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).

Sequenzvergleiche mit anderen Typen zeigen, dass alle humanen Adenoviren eine ähnliche Genomorganisation besitzen und nahezu die gleichen Genprodukte exprimieren (Shenk, 2001). Unterschiede der verschiedenen Gattungen werden als Anpassung an die jeweiligen Wirte interpretiert (Davison *et al.*, 2003).

### 2.1.3 Produktiver Infektionszyklus humaner Adenoviren

Humane Adenoviren infizieren *in vivo* ein großes Spektrum unterschiedlicher Zelltypen. Bevorzugte Zielzellen sind jedoch vor allem post-mitotisch ruhende 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 lytischen (produktiven) Vermehrungszyklus durchlaufen, resultieren Infektionsverläufe in Zellen tierischen Ursprungs meist abortiv (Liebermann *et al.*, 1996; Shenk, 2001). In neueren Arbeiten wird auch die Möglichkeit einer latenten Adenovirusinfektion diskutiert (Gustafsson *et al.*, 2007; Kosulin *et al.*, 2007; Garnett *et*

al., 2009).



**Abb. 4 Lebenszyklus von Ad5 im zeitlichen Verlauf**

Gezeigt ist eine Übersicht der unterschiedlichen Phasen des viralen Infektionszyklus von der Internalisierung 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). (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/00.001.htm>)

Der produktive Infektionszyklus wird in eine frühe und eine späte Phase unterteilt (Abb. 4). In der frühen Phase erfolgt nach Adsorption und Internalisierung des Virus der Kernimport des viralen DNA-Protein-Komplexes. Anschließend werden in einer zeitlich koordinierten Reihenfolge mehr als 20 regulatorische Proteine der frühen Transkriptionseinheiten E1A, E1B, E2, E3 und E4 exprimiert. Das Ziel der entsprechenden Genprodukte ist die Schaffung optimaler Bedingungen für die virale DNA-Synthese und die Produktion viraler Strukturproteine in der späten Phase der Infektion (Abb 4). Genprodukte der E1-Region induzieren die Zellzyklusprogression (E1A und E1B) und wirken antiviralen Schutzmechanismen der Zelle entgegen (E1B). Die frühe Transkriptionseinheit E2 kodiert für Proteine, die für die Replikation viraler DNA notwendig sind. Dagegen besitzen die Proteine der E3-Region hauptsächlich immunmodulatorische Funktionen und erschweren dadurch das Erkennen von virusinfizierten Zellen durch das Immunsystem (Gooding und Wold, 1990; Mathews und Shenk, 1991; Burgert und Blusch, 2000; Horwitz, 2001). Mit dem Einsetzen der viralen DNA-Replikation beginnt die späte Phase des lytischen Infektionszyklus. Sie ist gekennzeichnet durch die Expression der späten viralen Genprodukte, die Aktivierung der späten Transkriptionseinheit

(MLTU, *major late transcription unit*), das selektive Abschalten der zellulären Proteinsynthese (*host cell shutoff*) sowie der Assemblierung der Virionen. Schließlich endet der produktive Vermehrungszyklus mit der Freisetzung neu-synthetisierter Viruspartikel nach Lyse der Wirtszelle (Shenk, 2001).

## 2.2 Die Rolle der E4-Region in der lytischen Infektion

Die E4-Proteine agieren über ein komplexes Netzwerk aus Protein-Protein-Interaktionen mit zellulären Faktoren, die in Transkription, Apoptose, Zellzykluskontrolle, DNA-Reparaturmechanismen, Signalübertragung, post-translationalen Modifikationen und der Integrität von PML-NBs (PML *nuclear bodies*) involviert sind. Die E4-Region kodiert für mindestens sieben Proteine, die gemäß der Anordnung ihrer offenen Leserahmen als E4orf1 bis E4orf6/7 bezeichnet werden (Abb. 5). Dabei sind fünf dieser Leserahmen kollinear mit der viralen DNA, während zwei Leserahmen durch alternatives Spleißen eines ca. 2800 nt langen Primärtranskripts generiert werden (Herisse *et al.*, 1981; Freyer *et al.*, 1984; Virtanen *et al.*, 1984). Nach heutigem Wissensstand besitzen die Proteine der E4-Region wichtige regulatorische Funktionen um die Wirtszelle für eine optimale Virusreplikation zu manipulieren. Von den sieben Genprodukten der E4-Region, sind nur von einigen Funktionen für den lytischen Replikationszyklus bekannt. Daneben scheinen manche der lytischen Funktionen mit denen für die Transformation zu überlappen (siehe 2.3.5.2).

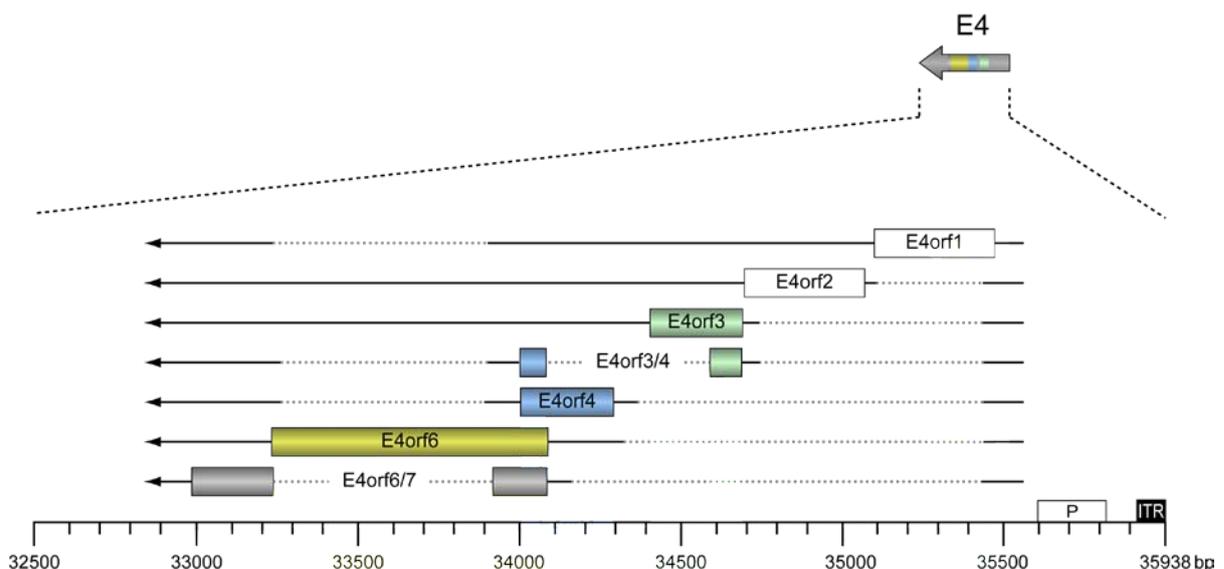


Abb. 5 Die E4-Region

Gezeigt ist eine vereinfachte Übersicht der E4-Transkriptionseinheit von Ad2 und Ad5 mit ihrer relativen Lage auf dem Ad-Genom. Ausgehend von einem gemeinsamen E4-Promotor (P) entsteht zunächst ein ca. 2800 nt langes Primärtranskript. Durch alternatives Spleißen werden bis zu 18 mRNA-Spezies generiert, die für derzeit sieben Proteine (E4orf1 bis E4orf6/7) kodieren (abgewandelt nach: Täuber und Dobner, 2001b).

### 2.2.1 E4orf3

E4orf3 und E4orf6 sind zwei Proteine mit teilweise redundanten Eigenschaften, die wichtige Funktionen für eine effiziente Replikation von Adenoviren besitzen (Bridge und Ketner, 1989; Huang und Hearing, 1989). Mit Hilfe von alternativ deletierten Virusmutanten konnte aufgeklärt werden, dass E4orf3 und E4orf6 an der viralen DNA-Replikation beteiligt sind (Bridge *et al.*, 1993). Nach heutigem Wissensstand beeinflussen beide viralen Faktoren die Expression später Strukturproteine, das Abschalten der Proteinsynthese der Wirtszelle (*host cell shutoff*) sowie die Produktion von Nachkommenviren (Huang und Hearing, 1989). Daneben regulieren E4orf3 und E4orf6 die Akkumulation später viraler mRNA-Transkripte (Nordqvist und Akusjärvi, 1990), indem sie konstitutives Spleißen der *Major Late 5' Leadersequenz* stimulieren, die für alle späten mRNAs der MLTU (Abb. 3) charakteristisch ist (Nordqvist *et al.*, 1994).

Zusätzlich induziert E4orf3 die Reorganisation von PML *nuclear bodies* (PML-NBs) im Zellkern (Carvalho *et al.*, 1995). Die Ausbildung fibrillärer Strukturen (*track-like structures, tracks*) ist dabei abhängig von der Assoziation von E4orf3 mit der PML-Isoform II (Hoppe *et al.*, 2006; Leppard *et al.*, 2009). PML-NBs sind sphärische Strukturen in den Zellkernen der meisten Zelltypen, die an einer Vielzahl von zellulären Prozessen, wie z. B. DNA-Reparatur, Proteinabbau, Apoptose, Genregulation, Tumorsuppression und der antiviralen Immunantwort beteiligt sind (Dellaire und Bazett-Jones, 2004). Die Reorganisation der PML-NBs ist für viele unterschiedliche Viren beschrieben (Moller und Schmitz, 2003). Im Verlauf der adenoviralen Infektion steht sie jedoch in direktem Zusammenhang mit einer effizienten Virusreplikation (Doucas *et al.*, 1996; Ullman und Hearing, 2008). Adenoviren zeichnen sich unter anderem durch eine effektive Inhibition und Modulation der zellulären DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturmechanismen (DSBR) zur Sicherung einer effizienten Virusvermehrung aus, da neu-synthetisierte lineare Virusgenome von der Zelle als massive DNA-Schädigung erkannt werden (Stracker *et al.*, 2002). E4orf3 interagiert dabei mit Mre11, einem wichtigen Bestandteil des zellulären Mre11-Rad50-NBS1-Komplex (MRN-Komplex). Als Folge dieser Wechselwirkung wird Mre11 inhibiert um vermutlich der Konkatemisierung von Virusgenomen entgegen zu wirken (Weiden und Ginsberg, 1994), sowie eine effiziente Virusreplikation zu unterstützen (Stracker *et al.*, 2002; Araujo *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden,

dass E4orf3 zusammen mit E1B-55K und E4orf6 wechselwirkt um eine Bildung von Konkate-  
 meren zusätzlich zu verhindern (Stracker *et al.*, 2002; Araujo *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005). Mit  
 der Inaktivierung des MRN-Komplexes durch E4orf3 und den E1B-55K/E4orf6-abhängigen  
 E3-Ubiquitinligase-Komplex werden auch alle nachfolgenden Schritte der DNA-Schadensant-  
 wort inhibiert. Dabei ist die Assoziation des MRN-Komplexes mit DNA-Enden vermutlich  
 eine der ersten Reaktionen in der Signaltransduktion bei der zellulären Antwort auf DNA-  
 Doppelstrangbrüche und ein strategisches Ziel um eine effiziente Virusreplikation sicher zu  
 stellen (Carson *et al.*, 2003). E4orf3- und E4orf6-negative Ad5-Mutanten zeigen unter anderem  
 aufgrund dessen einen replikationsdefekten Phänotyp (Evans und Hearing, 2003).

### 2.2.2 E4orf4

E4orf4 ist ein 114 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 13,4 kDa das  
 in allen Adenovirustypen konserviert ist. Obwohl keine Sequenzhomologien mit bekannten  
 zellulären Proteinen bestehen, konnten zum einen im Aminoterminus eine Prolin-reiche Re-  
 gion und zum anderen ein Arginin-reicher Abschnitt in der carboxyterminalen Hälfte des Pro-  
 teins identifiziert werden. Mutationen im Arginin-reichen Motiv zeigten dabei deutliche Aus-  
 wirkungen auf die Kernlokalisierung bzw. den Import in die Nukleoli und den E4orf4-vermit-  
 telten Zelltod. Außerdem zeigten mehrere Studien, dass Deletionen im E4orf4-Leserahmen,  
 die Expression des Genproduktes negativ beeinflussen (Shtrichman *et al.*, 1999; Marcellus *et al.*,  
 2000).

E4orf4 verändert unter anderem das Spleißen viraler RNAs indem es die Dephosphorylierung  
 von essentiellen Spleißfaktoren (SR-Proteinen) induziert, die während der Infektion einen  
 Wechsel im Spleißmuster des L1-Transkripts von der frühen zur späten Phase der Infektion  
 einleiten (Kanopka *et al.*, 1998; Nilsson *et al.*, 2001).

Gemeinsam mit E4orf1 aktiviert E4orf4 den mTOR-Signalweg unabhängig von Nährstoffsig-  
 nalen und anderen zellulären Stimuli. Die Aktivierung des mTOR-Signalwegs durch diese E4-  
 Proteine ist essentiell für einen E2F-unabhängigen Eintritt in den Zellzyklus und die virale Re-  
 plikation in primären SAE-Zellen (SAE, *small airway epithelia*; O'Shea *et al.*, 2005a).

Sowohl in der transienten Transfektion, als auch in der adenoviralen Infektion ist E4orf4 an  
 der E1A CR3-vermittelten transkriptionellen Inhibition der viralen E2- und E4-Promotoren  
 beteiligt (Bondesson *et al.*, 1996; Mannervik *et al.*, 1999).

Des Weiteren zeigten Untersuchungen, dass E4orf4 sowohl transient transfiziert und überex-  
 primiert (Lavoie *et al.*, 1998), als auch im Kontext einer Virusinfektion eine atypische Form des

Zelltods induzieren kann (Marcellus *et al.*, 1998). Obwohl dabei charakteristische Anzeichen für Apoptose in CHO-Zellen (CHO, *chinese hamster ovarian*; Lavoie *et al.*, 1998) und in vielen transformierten humanen Zelllinien beobachtet wurden (Shtrichman und Kleinberger, 1998; Robert *et al.*, 2002), scheint dieser Mechanismus Kaspase- und p53-unabhängig zu sein. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass E1A- und E1B-transformierte BRK Zellen für den E4orf4-induzierten Zelltod sensibilisiert sind (Shtrichman und Kleinberger, 1998).

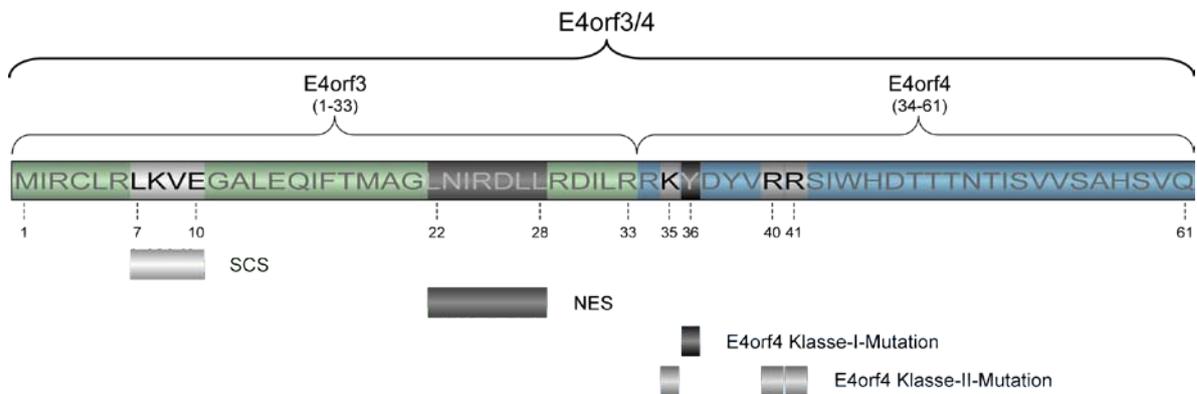
Aufgrund der Tatsache, dass die meisten Tumorzellen Mutationen im p53-Signalweg und in Apoptose-regulierenden Genen tragen, könnte E4orf4 ein potentes Werkzeug für die moderne Krebstherapie sein. Derzeit befassen sich einige Studien mit der zytotoxischen Wirkung von E4orf4 oder von ihm abgeleiteten rekombinanten Fusionsproteinen für eine anti-tumorale Anwendung (Mitrus *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006).

Das erste Protein, das durch eine Bindung an E4orf4 in Immunpräzipitationsexperimenten identifiziert wurde ist die ubiquitäre Serin-/Threonin-spezifische Phosphatase PP2A (*protein phosphatase 2A*) (Kleinberger und Shenk, 1993). Fast alle derzeit bekannten Funktionen und Eigenschaften von E4orf4 lassen sich auf die Wechselwirkung mit PP2A zurückführen. Während *in vivo* alle drei Untereinheiten des Holoenzym PP2A mit E4orf4 assoziieren, wurde *in vitro* nur für die PP2A  $B\alpha$ -Untereinheit eine direkte Bindung an E4orf4 nachgewiesen. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass der E4orf4/PP2A-Komplex eine Phosphatase-Aktivität besitzt. Diese Ergebnisse weisen sehr stark darauf hin, dass E4orf4 mit einem aktiven PP2A-Enzym assoziiert und möglicherweise dessen Substratspezifität oder andere Funktionen moduliert (Kleinberger und Shenk, 1993). Bindungsanalysen mit mutagenisierten E4orf4-Konstrukten und der PP2A  $B\alpha$ -Untereinheit in Säugerzellen identifizierten den Carboxyterminus von E4orf4 als Binderegion. Eine Veränderung dieser AS-Sequenzen beeinflusst den E4orf4 induzierten Zelltod (Marcellus *et al.*, 2000; Shtrichman *et al.*, 2000). Auf diese Weise wurden zwei Klassen von E4orf4-Mutationen definiert. Klasse-I-Mutationen führen zu einer verminderten Bindung von E4orf4 an PP2A und zu einer reduzierten *killung*-Aktivität, während Klasse-II-Mutationen trotz normaler Bindungslevel zu einer verminderten Zytotoxizität führen (vgl. Abb. 6; Marcellus *et al.*, 2000).

### 2.2.3 E4orf3/4

In Studien basierend auf Untersuchungen an Ad2 konnten bereits geringe Mengen der E4orf3/4-mRNA nachgewiesen werden, jedoch war der Proteinnachweis bislang noch nicht möglich (Freyer *et al.*, 1984; Virtanen *et al.*, 1984).

Da die DNA-Sequenz und Genomorganisation der E4-Region von Ad2 und Ad5 sehr ähnlich sind, ist anzunehmen, dass auch in Ad5-infizierten Zellen das E4orf3/4 mRNA-Transkript gebildet wird (Dix und Leppard, 1993). Auf Basis der mRNA-Sequenz besteht das erwartete Genprodukt aus 61 Aminosäuren (AS) und besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 7,2 kDa. Es setzt sich aus den 33 N-terminalen AS von E4orf3 und den 28 C-terminalen AS von E4orf4 zusammen. Daher ist anzunehmen, dass E4orf3/4 Funktionen beider E4-Volllänge Proteine besitzt (Abb. 6). Welche Rolle E4orf3/4 im lytischen Infektionszyklus von Ad5 spielt ist bisweilen unbekannt.



**Abb. 6 Mögliche funktionelle Bereiche des E4orf3/4-Proteins**

Schematische Übersicht funktioneller Bereiche von E4orf3 und E4orf4, die möglicherweise auch in E4orf3/4 eine Funktion ausüben (Bogerd *et al.*, 1996; Henderson und Eleftheriou, 2000; Marcellus *et al.*, 2000; Puntervoll *et al.*, 2003).

## 2.2.4 E4orf6

Das E4orf6-Genprodukt besitzt ein Molekulargewicht von 34 kDa und wird bereits früh im zeitlichen Verlauf einer Adenovirusinfektion exprimiert (Abb. 4; Boivin *et al.*, 1999). Es enthält eine Arginin-reiche amphipathische  $\alpha$ -Helix (AS 293 – 255) die als Kern-Lokalisationsignal (NLS, *nuclear localization signal*) dient (Orlando und Ornelles, 1999) und zusätzlich ein Leucin-reiches Kern-Exportsignal (NES, *nuclear export signal*), wodurch E4orf6 zwischen Zellkern und Zellplasma pendeln kann (Weigel und Dobbelstein, 2000). Diese Sequenzmotive in E4orf6 sind nicht nur für die Kern-Lokalisation wichtig, sondern auch für die Virusvermehrung und die Wechselwirkung mit E1B-55K. In diesem Zusammenhang konnte beobachtet werden, dass E1B-55K durch E4orf6 aus dem Zellplasma in den Kern relokalisiert wird (Orlando und Ornelles, 1999). Die Eigenschaft von E4orf6, die virale Replikation einzuleiten scheint dabei getrennt zu sein von dessen Eigenschaft das adenovirale E1B-55K zu relokalisieren (Orlando

und Ornelles, 2002).

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass E4orf6 die p53-vermittelte Transkriptionsaktivierung und Apoptose hemmt und damit die onkogene Transformation sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* erhöht (Dobner *et al.*, 1996). Seit gezeigt wurde, dass E1B-55K den Tumorsuppressor p53 binden kann und die p53-abhängige Transaktivierung beeinflusst, wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem E4orf6 und E1B-55K als Proteinkomplex agieren (Querido *et al.*, 2001). Im Gegensatz zum E6-Protein humaner Papillomviren kann E4orf6 Apoptose hemmen, indem es p53 auf einem Mdm2- und p19ARF-unabhängigen Weg degradiert. Der p53-Abbau kann durch den 26S Proteasomen-Inhibitor MG-132 blockiert werden (Bridge, 2000). Erst später wurde belegt, dass die Ausbildung eines E3-Ubiquitinligase-Komplexes mit E4orf6, E1B-55K, Elongin B und C und Cullin 5 essentiell für den Abbau von p53 ist (Blanchette *et al.*, 2004). Derzeit wird angenommen, dass dieser E3-Ubiquitinligase-Komplex eine entscheidende Rolle für die meisten E4orf6- und E1B-55K-vermittelten Funktionen spielt. In der späten Phase der Infektion wird der Export zellulärer mRNAs blockiert, während virale mRNAs bevorzugt ins Zellplasma transportiert werden (Beltz und Flint, 1979; Babiss *et al.*, 1985). Dieser Prozess wird nach heutigem Wissensstand ebenfalls den beiden viralen Genprodukten E1B-55K und E4orf6 zugeschrieben (Weigel und Döbelstein, 2000; Dosch *et al.*, 2001).

### 2.2.5 E4orf6/7

E4orf6/7 ist ein 17 kDa schweres, alternativ gespleißtes Genprodukt der E4-Region, welches aus den 58 aminoterminalen AS von E4orf6 und den 92 AS von E4orf7 zusammengesetzt ist. Viele Hinweise deuten darauf hin, dass E4orf6/7 als viraler Transaktivator Funktionen von E1A ergänzt und die Expression der viralen E2-Transkriptionseinheit und zellulärer Gene, die durch E2F-Transkriptionsfaktoren kontrolliert werden, fördert (Täuber und Dobner, 2001b). E4orf6/7 bindet E2F/DB-Heterodimere um diese Komplexe zu stabilisieren und im lytischen Infektionszyklus von Adenoviren die E2-vermittelte Transaktivierung zu induzieren (Helin und Harlow, 1994). E4orf6/7 alleine ist in der Lage pRB und p107 aus E2F-Heterodimeren freizusetzen und die Expression der E2-Transkriptionseinheit über eine Induktion der E2F-Bindung an den frühen E2-Promotor zu aktivieren, wodurch die Replikation von E1A-defizienten Adenoviren in HeLa-Zellen signifikant erhöht wird (O'Connor und Hearing, 2000). Adenoviren haben vermutlich zwei Mechanismen entwickelt, um die Expression von E2F-kontrollierten Genen zu induzieren. Dabei binden die E1A-Genprodukte Proteine der pRB-Familie wodurch die Repression von E2F-kontrollierten Promotoren aufgehoben wird. Diese

E1A-Funktion wird durch E4orf6/7 ergänzt, indem es aktiv E2F-Faktoren rekrutiert und zu den Promotoren bringt um über invertierte E2F-Bindestellen die Expression zu transaktivieren (Schaley *et al.*, 2000). Außerdem ist E4orf6/7 zusammen mit E1A in der Lage primäre BRK-Zellen zu transformieren und eine p53-abhängige Apoptose zu induzieren. Die carboxyterminale Hälfte von E4orf6/7 ist vermutlich für diese Funktionen wichtig (Yamano *et al.*, 1999).

## **2.3 Transformation und Onkogenität humaner Adenoviren**

In den vergangenen 40 Jahren konnten molekularbiologische Untersuchungen an humanen Adenoviren viel zum Verständnis von grundlegenden Mechanismen des normalen und malignen Zellwachstums beitragen. Frühe Beobachtungen zum kanzerogenen Potenzial humaner Adenoviren eröffneten bedeutende Einblicke in molekulare Mechanismen der Tumorentstehung und etablierten Adenoviren als Modellsystem zur Erforschung virusvermittelter Transformationsprozesse.

### **2.3.1 Onkogenes Potenzial humaner Adenoviren**

Bis heute konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Entstehung menschlicher Tumorerkrankungen und humanen Adenoviren hergestellt werden (Mackey *et al.*, 1976; Mackey *et al.*, 1979; Wold *et al.*, 1979; Chauvin *et al.*, 1990). Trentin und Mitarbeiter zeigten jedoch 1962, dass Ad12 als erstes humanpathogenes Virus onkogene Eigenschaften in neugeborenen Hamstern besitzt (Trentin *et al.*, 1962). In weiteren Arbeiten konnte nur für bestimmte Typen (Ad12, Ad18, Ad31) ein onkogenes Potenzial nachgewiesen werden (Graham, 1984). Verschiedene Typen wurden abhängig von der Effizienz und Latenzzeit der Tumorentstehung, als nicht-onkogen, schwach-onkogen oder hoch-onkogen eingestuft (Tab. 1).

**Tab. 1 Onkogenität der humanen Adenovirustypen**

Einordnung humaner Adenovirustypen, nach deren onkogenem Potenzial im Nagetiermodell. Die Typen 50 - 54 können derzeit noch nicht in diese Tabelle eingeordnet werden.

Onkogenität	Subgruppe	Typ	Art der Tumoren
hoch-onkogen	A	12, 18, 31	undifferenzierte Sarkome, Fibroadenome
	D	9, 10	
schwach-onkogen	B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35	undifferenzierte Sarkome
	C	1, 2, 5, 6	
nicht-onkogen	D	8, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30	keine Tumoren
		32, 33, 36-39, 42-49	
	E	4	
	F	40, 41	

Zu den hoch onkogenen Typen zählt man Viren, die mit sehr großer Effizienz und kurzer Latenzzeit Tumoren in Nagetieren induzieren. Virustypen werden hingegen als schwach onkogen eingestuft, wenn eine Tumorinduktion nur unregelmäßig und mit langen Inkubationszeiten beobachtet werden kann. Viren der Subgruppe D gelten allgemein als nicht onkogen. Einzige Ausnahme bilden Ad9 und Ad10, welche östrogenabhängige Mammakarzinome in weiblichen Ratten induzieren (Ankerst *et al.*, 1974; Jonsson und Ankerst, 1977; Ankerst und Jonsson, 1989; Javier *et al.*, 1991).

### 2.3.2 Transformation von Nagerzellen in Kultur

Ungeachtet ihres Potenzials Tumoren in Nagetieren zu erzeugen, besitzen sowohl onkogene als auch nicht onkogene Adenoviren die Fähigkeit, Nager-Zellen *in vitro* zu transformieren. Dabei werden die transformierten Zellen morphologisch so verändert, dass sie als dichte und vielschichtige Kolonien (*Foci*) auswachsen und verschiedene phänotypische Merkmale onkogener Transformation aufweisen. Jedoch besitzen nicht alle dieser transformierten Zelllinien das Potenzial nach Inokulation in Nagetieren, Tumoren zu erzeugen. Im Gegensatz zu Ad12-transformierten Zellen, die in syngenen, immunkompetenten Ratten Tumoren bilden, können durch Ad2- oder Ad5-transformierte Rattenzellen keine Tumoren in Ratten erzeugen. Allerdings können Ad2-/Ad5- und Ad12-transformierte Zellen in thymusdefizienten Nacktmäusen, denen die MHC-Klasse-I zytotoxischen T-Zellen fehlen, Tumoren induzieren (Bernards *et al.*, 1982). Diese Ergebnisse zeigten, dass die Tumorigenität von Adenovirus-transformierten Zellen hauptsächlich von den thymusabhängigen CTL-Komponenten des Immunsystems der Wirtstiere beeinflusst wird (Raska und Gallimore, 1982;

Bernards *et al.*, 1983; Cook und Lewis, 1987). Neueren Daten zufolge muss die Möglichkeit in Erwägung gezogen werden, dass zusätzliche Mechanismen bestehen, die eine Tumorbildung durch adenovirale Zelltransformation fördern. Dabei spielen vermutlich Genprodukte die in der E4-Region kodiert sind, eine Rolle (Täuber und Dobner, 2001a).

### 2.3.3 Transformation humaner Zellen in Kultur

Trotz ihrer onkogenen Eigenschaften in Tieren und ihrer Fähigkeit, primäre Nagerzellen in Kultur vollständig zu transformieren, konnte bisher kein direkter Zusammenhang zwischen Adenoviren und der Tumorentstehung beim Menschen gefunden werden. Die Tatsache, dass viele Versuche fehlgeschlagen sind, humane Zellen in Kultur mit Adenoviren zu transformieren, weist darauf hin, dass eine abortive Infektion einer der Faktoren ist der mit einer hoch-effizienten Transformation von nicht permissiven Nagerzellen assoziiert ist. Interessanterweise ist die Transformation humaner Zellen mit nicht infektiösen, subgenomischen, viralen DNA-Fragmenten im Vergleich zu Nagerzellen ebenfalls außerordentlich ineffizient. Dies lässt darauf schließen, dass die Permissivität nicht der einzige determinierende Faktor für die Transformationseffizienz darstellt. Die molekularen Grundlagen, die dieser Beobachtung zugrunde liegen, sind jedoch noch weitgehend unbekannt (Shenk und Flint, 1991; Hutton *et al.*, 2000). 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 z. B. humane embryonale Nierenzellen (HEK, *human embryonic kidney cells*; Graham *et al.*, 1977; Whittaker *et al.*, 1984), humane embryonale Lungenzellen (HEL, *human embryonic lung cells*; van den Heuvel *et al.*, 1992), humane embryonale Retinoblasten (HER, *human embryonic retinoblasts*; Byrd *et al.*, 1982; Gallimore *et al.*, 1986; Fallaux *et al.*, 1996) und Amniozyten (Schiedner *et al.*, 2000).

### 2.3.4 Persistenz und DNA-Integration

Die meisten Adenovirus-induzierten Tumoren, Tumorzelllinien und transformierten Zellklone zeichnen sich durch die Persistenz der viralen DNA über chromosomale Integration und die Expression von virusspezifischen Antigenen aus. Dementsprechend folgt die adenovirale Transformation 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 Sequen-

zen nicht unbedingt für die Aufrechterhaltung des onkogenen Phänotyps benötigt werden (Paraskeva und Gallimore, 1980; Kuhlmann *et al.*, 1982; Paraskeva *et al.*, 1982; 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 Nagerzellen, die durch Ad2 oder Ad5 transformiert wurden, nur Teile des viralen Genoms (Graham, 1984).

## **2.3.5 Struktur und Funktion adenoviraler Onkoproteine**

### **2.3.5.1 E1-Region und die klassische Transformation**

Das onkogene Potenzial humaner Adenoviren wird hauptsächlich der E1-Region zugeschrieben (Tooze, 1981; Graham, 1984), da in virustransformierten Zellen die E1-Gene konsistent persistieren und die Expression der E1-Proteine nach Transfektion zu einer onkogenen Transformation führt. Diese Region, die am linken Ende des adenoviralen Genoms lokalisiert ist (Abb. 3) und für die Genprodukte der E1A- und E1B-Transkriptionseinheiten kodiert, ist daher für eine vollständige morphologische Transformation ausreichend (Bernards und Van der Eb, 1984; Graham, 1984; Shenk, 2001; Endter und Dobner, 2004).

Nach einem einfachen Modell induzieren dabei die E1A-Proteine die Immortalisierung primärer Zellen, während die E1B-Genprodukte die Ausbildung eines vollständig transformierten Phänotyps und dessen Aufrechterhaltung benötigt werden (Williams *et al.*, 1995). Die beiden nukleären, multifunktionellen Phosphoproteine (E1A 12S und E1A 13S) der E1A-Transkriptionseinheit sind in der Lage, Zellen durch die Aufhebung der Zellzyklusbarrieren zu immortalisieren (Houweling *et al.*, 1980) und, zusammen mit anderen viralen oder zellulären Onkogenen, Zellen zu transformieren. Diese Funktionen werden durch Interaktionen mit wachstumsinhibitorischen und genregulatorischen Proteinen gewährleistet (Russel, 2000). Neben den transformierenden Eigenschaften besitzen die E1A-Genprodukte auch die Fähigkeit Apoptose zu induzieren. Neben p53-abhängigen Apoptosewegen, die durch die Stabilisierung und Aktivierung des zellulären Tumorsuppressors p53 gekennzeichnet sind (White, 1995; Chinnadurai, 1998; White, 1998), ist E1A auch in der Lage den Zelltod unabhängig von p53 einzuleiten (Teodoro *et al.*, 1995; Marcellus *et al.*, 1996). Zur vollständigen Transformation primärer Zellen sind jedoch neben den E1A- auch die E1B-Genprodukte notwendig. Die E1B-Transkriptionseinheit von Ad5 kodiert für zwei Onkoproteine, E1B-55K und E1B-19K. Beide Proteine transformieren in Kooperation mit E1A primäre Nagerzellen, indem sie unabhängig

voneinander, jedoch additiv wirken (Gallimore *et al.*, 1985; McLorie *et al.*, 1991). Dabei sind Funktionen beider E1B-Proteine, die auf unterschiedlichen Wegen den E1A-induzierten Zelltod entgegenwirken, von Bedeutung (Chinnadurai, 1998; White, 1998). Das E1B-19K-Protein ist dem zellulären Protoonkogen Bcl-2 funktionell ähnlich und interagiert mit zellulären Apoptoseregulatoren. Obwohl E1B-19K nicht an p53 bindet, kann es über einen noch unbekanntem Mechanismus die p53-induzierte Transrepression aufheben, die über den Carboxyterminus des Tumorsuppressorproteins vermittelt wird. Im Gegensatz dazu interagiert E1B-55K direkt mit einer aminoterminalen Domäne von p53 und inhibiert über seine intrinsische Repressorfunktion die Transaktivierung p53-regulierter Gene (White, 1996). Diese Repression hängt jedoch von mehreren Faktoren ab, u. a. spielt dabei die Konjugation von SUMO-1 an E1B eine wichtige Rolle (Endter *et al.*, 2001). Aktuellere Daten zu E1B-55K (Härtl *et al.*, 2008) und E1B-156R (Sieber und Dobner, 2007) deuten jedoch darauf hin, dass bei diesen Transformationsprozessen auch p53-unabhängige Mechanismen beteiligt sind. Im Gegensatz zu den E1A- und E1B-Genprodukten stellt E4orf1 bei Ad9 (Subgruppe D) dessen alleinige onkogene Determinante dar (Javier *et al.*, 1992) und letzten Ergebnissen zufolge liegt auch das onkogene Potenzial der Subgruppe A- und C-Adenoviren nicht ausschließlich in der E1-Region. Eine wichtige Rolle spielen hier die Genprodukte der E4-Region (Täuber und Dobner, 2001a; Täuber und Dobner, 2001b).

### 2.3.5.2 E4-Genprodukte in der Transformation

Neben der E1-Region können auch der E4-Region (Abb. 5) wichtige Funktionen für das transformierende Potenzial von Adenoviren zugeordnet werden. Dabei agieren die E4-Proteine über ein komplexes Netzwerk aus Protein-Protein-Interaktionen mit zellulären Faktoren, die in Transkription, Apoptose, Zellzykluskontrolle, DNA-Reparaturmechanismen, Signalübertragung, post-translationalen Modifikationen und der Integrität von PML-NBs (PML *nuclear bodies*) involviert sind. Einige der lytischen Funktionen sind unter anderem auch für die onkogene Transformation primärer Säugerzellen mit verantwortlich (Täuber und Dobner, 2001a). E4orf1 ist das erste von sieben Proteinen, die in der frühen Region 4 humaner Adenoviren kodiert sind. Untersuchungen zur Funktion von E4orf1 wurden größtenteils mit dem hoch onkogenen Ad9 und weniger mit den schwach- bzw. nicht-onkogenen Typen Ad2 bzw. Ad5 durchgeführt. Aminosäure-Sequenzanalysen weisen jedoch darauf hin, dass E4orf1 verschiedener Adenovirustypen konserviert zu sein scheint und möglicherweise ähnliche Funktionen ausübt. Im Gegensatz zu den E1A kodierten Proteinen ist E4orf1 die onkogene Hauptdetermi-

nante Ad9-induzierter Brustgewebstumore (Thomas *et al.*, 1999). Dabei konnte gezeigt werden, dass Ad9 E4orf1 bei CREF Rattenembryo Fibroblasten die Transformation einleiten kann, indem es die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) unabhängig von der Signalwirkung durch Wachstumsfaktoren, konstitutiv aktiviert (Frese *et al.*, 2003). Ad5 E4orf1 kann in primären Zielzellen humaner Adenoviren (SAEC, *small airway epithelia cells*) während des lytischen Infektionszyklus PI3K auf eine ähnliche Weise aktivieren. Zusammen mit E4orf4 kann E4orf1 die *Cap*-abhängige Translation durch einen Nährstoff unabhängigen Mechanismus aktivieren (O'Shea *et al.*, 2005b). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Bindung des Carboxyterminus von Ad9 E4orf1 an PDZ Domänen negativ regulierender Zellwachstumsfaktoren für dessen transformierende Eigenschaften notwendig ist (Lee *et al.*, 1997; Weiss und Javier, 1997; Glaunsinger *et al.*, 2001).

Über das E4orf2 Genprodukt ist bisher sehr wenig bekannt. Es scheint in den unterschiedlichen Adenovirustypen konserviert zu sein und wird früh in Ad5-infizierten Zellen exprimiert. Derzeit sind keine zellulären Proteine bekannt mit denen E4orf2 wechselwirkt (Dix und Leppard, 1995). Möglicherweise besitzt jedoch ein DNA-Fragment von Ad9 E4orf2 eine wichtige Funktion bei der Ad9 E4orf1-vermittelten Transformation von Brustgewebszellen (Thomas *et al.*, 2001).

E4orf3 induziert neben den lytischen Funktionen zusätzlich die Reorganisation von PML nuclear bodies (PML-NBs) im Zellkern (Carvalho *et al.*, 1995). Im Gegensatz zu E4orf6 ist die Fähigkeit von E4orf3, die onkogene Transformation zu fördern nicht mit der Modulation von p53-Funktionen verbunden. Vielmehr hängen die transformierenden Eigenschaften von E4orf3 durch dessen Bindung an E1B-55K und der Kolokalisation mit PML-NBs zusammen, jedoch unabhängig von dessen Interaktionen mit dem PML-Protein (Nevels *et al.*, 1999b). Diese Beobachtungen passen sehr gut zu einem Modell, indem durch die Reorganisation der PML-NBs eine Kaskade von Reaktionen beeinflusst wird, die zu unkontrollierter Zellproliferation sowie neoplastischem Wachstum führt. Dabei scheinen die Wechselwirkungen von viralen Proteinen mit PML-NBs, sowie die bereits beschriebenen Funktionen von E4orf3 für die lytische Infektion mit der onkogenen Transformation zusammen zu hängen (Täuber und Dobner, 2001a). Daneben sind E4orf3 und E4orf6 gemeinsam mit E1A in der Lage, Zellen nach einem "Hit & Run"-Szenario zu transformieren. Dabei sind die viralen Genprodukte zwar notwendig um primäre BRK-Zellen zu transformieren, während diese jedoch für die Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps nicht mehr benötigt werden und verloren gehen (Nevels *et al.*, 2001). Obwohl hierfür die molekularen Mechanismen noch nicht bekannt sind,

wird vermutet, dass dies möglicherweise durch E4-Wechselwirkungen mit PML-NBs und einer damit verbundenen Beeinflussung der genomischen Stabilität zusammenhängt (Zhong *et al.*, 1999; Fogal *et al.*, 2000). Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass E4orf6 die p53-vermittelte Transkriptionsaktivierung und Apoptose hemmt und dem zu Folge die onkogene Transformation sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* erhöht (Dobner *et al.*, 1996). Seit gezeigt wurde, dass E1B-55K den Tumorsuppressor p53 binden kann und die p53-abhängige Transaktivierung beeinflusst, wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem E4orf6 und E1B-55K als Proteinkomplex agieren (Querido *et al.*, 2001).

In Versuchen mit immunsupprimierten Nacktmäusen konnte außerdem demonstriert werden, dass E4orf6 zusammen mit E1A allein, oder in Kombination mit E1A und E1B-55K oder mit E1A und E1B-19K, sowohl *in vitro* in primären BRK-Zellen, als auch *in vivo* nach Injektion in Nacktmäuse eine maligne Transformation induziert (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997). E4orf6 trägt zur malignen Transformation bei, indem es der E1A induzierten Akkumulation von p53 entgegenwirkt. Diese Eigenschaft wird ebenfalls mit dem E3-Ubiquitinligase-Komplex in Verbindung gebracht. Mehrere AS Bereiche am Amino- als auch Carboxyterminus von E4orf6 besitzen Regionen die wichtig für die Destabilisation von p53 sind, allen voran ein Cystein-reiches Motiv und die Arginin-reiche amphipathische  $\alpha$ -Helix in der Onkodomäne am Carboxyterminus von E4orf6 (Nevels *et al.*, 2000).

## 2.4 Adenoviren in der Gentherapie

Im letzten Jahrzehnt fokusierte sich die Arbeit an humanen Adenoviren zum Großteil auf deren Anwendung als Vektorsystem zur Behandlung von Tumor- und genetisch bedingten Erkrankungen. Aufgrund ihrer einfachen Vermehrung in Gewebekultur zu hohen Virustitern und ihres breiten Zelltropismus wurde bereits gegen Ende der siebziger Jahre die Anwendung von Adenoviren als Vektorsystem diskutiert (Yaniv, 1979). Die ersten replikationsdefekten Adenovirus-Vektoren basierten auf Deletionen der E1-Region und/oder der E3-Region (*first generation vectors*) (Russel, 2000). Nachdem diese Vektoren jedoch eine erhöhte *in vivo*-Toxizität aufwiesen und eine verstärkte Immunantwort gegen die transduzierten Zellen hervorriefen, wurden Vektoren der zweiten Generation entwickelt (*second generation vectors*). Diese Vektoren zeichnen sich durch eine zusätzliche Deletion der E4-Region aus, was zu einer Reduktion der oben genannten Effekte führen sollte. Während diese Vektoren tatsächlich eine stark verringerte Toxizität und schwächere Immunantwort zur Folge hatten (Gao *et al.*, 1996;

Lusky *et al.*, 1998; O'Neal *et al.*, 1998; Christ *et al.*, 2000; Rafii *et al.*, 2001), gab es jedoch widersprüchliche Daten bezüglich der Persistenz des Transgens (Gao *et al.*, 1996; Armentano *et al.*, 1997; Brough *et al.*, 1997; Dedieu *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997; Grave *et al.*, 2000). Es folgte die Entwicklung einer dritten Generation replikationsdefekter Adenovirus-Vektoren (*third generation vectors*). Hier kann das virale Genom bis auf die invertierten und terminalen Sequenzwiederholungen (ITRs, *inverted terminal repeats*) durch Fremd-DNA (>30 kBp) ersetzt werden (Kochanek, 1999). Inzwischen wurden neben diesen replikationsdefekten Vektoren der ersten, zweiten und dritten Generation auch konditional replikationskompetente Virusmutanten erprobt. Dabei handelt es sich um bedingt vermehrungsfähige Viren, die ganze oder teilweise-deletierte E1A/E1B- und E4-Transkriptionseinheiten enthalten und aufgrund genetischer Veränderungen in den Kontrollregionen und/oder kodierenden Bereichen der E1A und E1B-Gene scheinbar selektiv in bestimmten Tumorzelltypen replizieren (Alemany *et al.*, 2000; Gómez-Navarro und Curiel, 2000). Ein wichtiger Vertreter dieser Vektorgruppe ist dl1520 (ONYX-015) eine E1B-55K-defekte Virusmutante (Barker und Berk, 1987; Bischoff *et al.*, 1996). Aufgrund des immer besser werdenden Verständnisses der molekularen Grundlagen für die tumorspezifische Replikation (Alemany *et al.*, 2000; Dix *et al.*, 2001; O'Shea *et al.*, 2004), stellen ONYX-015 und davon abgeleitete onkolytische Vektoren ein neues vielversprechendes Konzept zur Behandlung von Tumorerkrankungen dar.

## 2.5 Zielsetzung und Aufgabenstellung

Obwohl die mRNA für das adenovirale Fusionsprotein E4orf3/4 bereits 1984 durch zwei unabhängige Forschungsgruppen (Freyer *et al.*, 1984; Virtanen *et al.*, 1984) in Ad2-infizierten HeLa-Zellen identifiziert wurde, gibt es bisher keine Informationen über dessen Funktionen während des produktiven Infektionszyklus humaner Adenoviren. Da die beiden Typen Ad2 und Ad5 der Spezies C Adenoviren sehr eng miteinander verwandt sind, liegt die Vermutung nahe, dass E4orf3/4 auch im Verlauf der Ad5-Infektion exprimiert wird.

Ein Hauptziel dieser Arbeit bestand darin, mit Hilfe eines in Vorarbeiten neu entwickelten Verfahrens, das die Herstellung von Adenovirusmutanten mit definierten Veränderungen in den E1B-, E4- und E1B/E4-Genen vereinfacht, Ad5 E4orf3-, E4orf4- und E4orf3/4-Nullmutanten zu generieren, um funktionelle Analysen zur Funktion von E4orf3/4 im produktiven Replikationszyklus von Ad5 durchzuführen.

Zur Identifikation biologischer Funktionen von E4orf3/4 sollten außerdem *Focus-Formationsstudien* durchgeführt werden. Diese sollten wichtige Hinweise auf den Einfluss von E4orf3/4 auf die E1A- und E1B-55K-vermittelte Transformation primärer Rattennierenzellen (*primary baby rat kidney*, pBRK) geben. Zusätzlich sollte mit E4orf3/4 im Hefe-Zwei-Hybrid System eine Interaktionssuche durchgeführt, um zelluläre Interaktionspartner von E4orf3/4 auf Protein-Ebene zu identifizieren und um damit weitere Aufschlüsse über mögliche Funktionen von E4orf3/4 im lytischen Replikationszyklus vom humanen Adenoviren zu erhalten.

## 3 Material

---

---

### 3.1 Zellen

#### 3.1.1 Bakterienstämme

---

BEZEICHNUNG	MERKMAL
DH5 $\alpha$	<i>supE44, <math>\Delta</math>lacU169, (<math>\phi</math>80dlacZ<math>\Delta</math>M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i> (Hanahan und Meselson, 1983).
XL2-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F'proAB, lacI<math>\phi</math>Z<math>\Delta</math>M15, Tn10 (Tet<sup>r</sup>), Amy, Cam<sup>r</sup>]</i> (Stratagene).

---

#### 3.1.2 Hefestämme

Bei dem in dieser Arbeit beschriebenen Hefe-Zwei-Hybrid *Screen* kamen Y153-Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*; MATa leu2-3,112, ura3-52, trp1-901, his3- $\Delta$ 200, ade2- $\Delta$ 101, gal4 $\Delta$ gal80 $\Delta$  URA3; GAL-lacZ, LYS2; GAL-HIS3) zum Einsatz (Durfee *et al.*, 1993).

#### 3.1.3 Säugerzelllinien

---

BEZEICHNUNG	MERKMAL
pBRK	Primäre Nierenzellen aus 3 - 5 Tage alten CD-Ratten (Charles River).
A549	Humane Lungenkarzinom Zelllinie, Wildtyp p53 (Giard <i>et al.</i> , 1973).
H1299	Humane, p53-negative Lungenkarzinom Zelllinie (Mitsudomi <i>et al.</i> , 1992).
HEK 293	Humane, embryonale Nierenzellen ( <i>human embryonic kidney cells</i> ), die die Ad5 E1-Region stabil exprimieren (Graham <i>et al.</i> , 1977).
HEK 293T	HEK 293 Zellen, die das Large T Antigen des Simian Virus 40 (SV40) exprimieren.

## MATERIAL

<b>2E2</b>	293 EBNA Tet Zelllinie, generiert aus HEK 293. Ad5 E2A und E4orf6 sind Tetrazyklin-abhängig induzierbar (Catalucci <i>et al.</i> , 2005).
<b>W162</b>	Verozellen (permanente Affennieren-Zellen) transformiert mit Ad2 E4-Region (Weinberg und Ketner, 1983).
<b>MIO-M1</b>	Humane, "pseudoprimäre", retinale Glia-Zellen (Limb <i>et al.</i> , 2002).

### 3.2 Adenoviren

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

#	BEZEICHNUNG	MERKMAL
100	<b>H5pg4100</b>	Wildtyp Ad5 mit einer 1863 Bp langen Deletion (nt 28602 bis nt 30465) des Ad5 E3-Leserahmens (Kinds Müller <i>et al.</i> , 2007).
150	<b>H5pm4150</b>	Ad5 E4orf3-Nullmutante mit einer <i>frame shift</i> Mutation nach Codon 37 durch ein eingeführtes Thymidin an Position nt 34592 (erster Stop bei Codon 38) (Speiseder, 2006).
154	<b>H5pm4154</b>	Ad5 E4orf6-Nullmutante mit einem AS Austausch zum Stopcodon an der Position 66 (Blanchette <i>et al.</i> , 2004).
155	<b>H5pm4155</b>	Ad5 E4orf3- 6--Doppelnullmutante. Kombination aus H5pm4150 und H5pm4154 (Speiseder, 2006).
163	<b>H5pm4163</b>	Ad5 E4orf3/4-Nullmutante mit einer Mutation der Spleißdonorstelle D2a (diese Arbeit).
164	<b>H5pm4164</b>	Ad5 E4orf3- 3/4--Doppelnullmutante. Kombination aus H5pm4150 und H5pm4163 (diese Arbeit).
166	<b>H5pm4166</b>	Ad5 E4orf4-Nullmutante mit verändertem Startcodon und eingeführten Stopcodon an AS-Position 12 (Miron <i>et al.</i> , 2009).
183	<b>H5pm4183</b>	Ad5 E4orf3- 4--Doppelnullmutante. Kombination aus H5pm4150 und H5pm4166 (diese Arbeit).
184	<b>H5pm4184</b>	Ad5 E4orf4- 3/4--Doppelnullmutante. Kombination aus H5pm4163 und H5pm4166 (diese Arbeit).
195	<b>H5pm4195</b>	Ad5 E4orf3- 4- 3/4--Dreifachnullmutante. Kombination aus H5pm4150, H5pm4163 und H5pm4166 (diese Arbeit).

## MATERIAL

---

---

203	<b>H5 GFP-E4orf4</b>	Ad5 mit N-terminal GFP-fusionierten E4orf4 (Stammsammlung der Arbeitsgruppe).
209	<b>H5pm4209</b>	Ad5 mit N-terminal FLAG-fusionierten E4orf3 (diese Arbeit).
210	<b>H5pm4210</b>	Ad5 mit N-terminal FLAG-fusionierten E4orf3/4; E4orf3-Nullmutante. Kombination aus H5pm4150 und H5pm4209 (diese Arbeit).
211	<b>H5pm4211</b>	Ad5 mit N-terminal FLAG-fusionierten E4orf3; E4orf3/4-Nullmutante. Kombination aus H5pm4163 und H5pm4209 (diese Arbeit).
212	<b>H5pm4212</b>	Ad5 mit N-terminal FLAG-fusionierten E4orf3; E4orf3- 3/4-Doppelnulmutante. Kombination aus H5pm4164 und H5pm4209 (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.

---

#	BEZEICHNUNG	5'-3' SEQUENZ	VERWENDUNG
635	<b>pcDNA3-forw</b>	ATG TCG TAA CAA CTC CGC	Sequenzierung
765	<b>E4orf3f bp 32918 rev</b>	CCC TGC GAA GGG ACC TAC G	Sequenzierung
956	<b>E4[1048-1068]5'</b>	CTT TTT TAC TGG TCT GTG AGG AAC	Sequenzierung Amplification
962	<b>E4[2752-2771]3'</b>	GGG CGG CGA AGG AGA AGT CC	Sequenzierung Amplification
1363	<b>E4orf3- fw</b>	GGT GGC GAG ATT GAG AAT TAT TTG GGC	Mutagenese
1364	<b>E4orf3- rev</b>	GCC CAA ATA ATT CTC AAT CTC GCC ACC	Mutagenese
1365	<b>E4orf3/4 NoDo fw</b>	GAG ATA TAT TGA GAC GCT GGC GAG ATG AG	Mutagenese

## MATERIAL

1366	<b>E4orf3/4 NoDo rev</b>	CTC ATC TCG CCA GCG TCT CAA TAT ATC TC	Mutagenese
1653	<b>BamHI-E4orf4-fwd</b>	ATG GAT CCG TTC TTC CAG CTC TTC CCG C	Klonierung
1654	<b>XhoI-E4orf4-rev</b>	ATC TCG AGC TAC TGT ACG GAG TGC GCC	Klonierung
1659	<b>BamHI-E4orf3-fwd</b>	ATG GAT CCA TTC GCT GCT TGA GGC TGA AGG	Klonierung
1660	<b>XhoI-E4orf3-rev</b>	ATC TCG AGT TAT TCC AAA AGA TTA TCC AAA ACC TC	Klonierung
1821	<b>Flag E4orf3 fwd</b>	GGA ACC TGA ATT TTT GCA ATC ATG ATT GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG ATT CGC TGC TTG AGG CTG AAG G	Mutagenese
1822	<b>Flag E4orf3 rev</b>	CCT TCA GCC TCA AGC AGC GAA TCT TGT CAT CGT CGT CCT TGT AGT CAA TCA TGA TTG CAA AAA TTC AGG TTC C	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
136	<b>pcDNA3</b>	Expressionsvektor für Säugerzellen, CMV-Promotor	Invitrogen
196	<b>pcDNA3flu</b>	Expressionsvektor für Säugerzellen für HA-tag Fusionen, CMV-Promotor	Invitrogen
213	<b>pGBKT7 (TCC)</b>	Hefe-Vektor; Für Expression von Fusionsproteinen mit der Gal4-DNA-Bindedomäne; Deletion in der EcoRI-Schnittstelle (GAATTC→GATTC) zur Veränderung des Leserahmens.	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1155	<b>E4-Box-S2</b>	Mutagenese	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
222	<b>LeGO-iV2</b>	Lentiviraler Expressionsvektor	(Weber <i>et al.</i> , 2008)

## MATERIAL

223	<b>LeGO-iCer2</b>	Lentiviraler Expressionsvektor	(Weber <i>et al.</i> , 2008)
104	<b>pACT</b>	Vektor für die humane cDNA-Datenbank aus $\lambda$ ACT, ADC1-Promoter	(Durfee <i>et al.</i> , 1993)

### 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
668	<b>pcDNA-E4orf3</b>	pcDNA3	Ad5 E4orf3	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
737	<b>pE1A</b>	pML	Ad5 E1A	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
949	<b>pcDNA3-E4orf3/4</b>	pcDNA3	Ad5 E4orf3/4	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1319	<b>pcDNA-E1B-55K (pE1b)</b>	pcDNA3	Ad5 E1B-55K	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1558	<b>E4orf3/4-Flag</b>	pCMX3b-Flag	Ad5 E4orf3/4	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1923	<b>pGBKT7mod-E4orf3/4</b>	pGBKT7	Ad5 E4orf3/4	diese Arbeit
1983	<b>LeGO-iCer2_E1B-55K</b>	LeGO-iCer2	Ad5 E1B-55K	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1997	<b>LeGO-iV2-E1A</b>	LeGO-iV2	Ad5 E1A	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1968	<b>pCMV-VSV-G</b>	pCMV	Hüllprotein G (VSV-G) des vesikulären Stomatitis-Virus	(Beyer <i>et al.</i> , 2002)
1969	<b>pRSV-Rev</b>	pRSV	HIV-1 <i>Rev</i>	(Dull <i>et al.</i> , 1998)
1970	<b>pMDLg/pRRE</b>	pMDL	HIV-1 <i>Gag</i> , HIV-1 <i>Pol</i>	(Dull <i>et al.</i> , 1998)
2086	<b>pcDNA3-HA E4orf4 full length new</b>	pcDNA3flu	Ad5 E4orf4	diese Arbeit

## MATERIAL

2087	<b>pcDNA3-HA E4orf4 del106-114aa</b>	pcDNA3flu	Ad5 E4orf4 del106-114aa	diese Arbeit
2088	<b>pcDNA3-HA E4orf4 del97-114aa</b>	pcDNA3flu	Ad5 E4orf4 del97-114aa	diese Arbeit
2089	<b>pcDNA3-HA E4orf3 full length new</b>	pcDNA3flu	Ad5 E4orf3	diese Arbeit
2090	<b>pcDNA3-HA E4orf3/4 full length new</b>	pcDNA3flu	Ad5 E4orf3/4	diese Arbeit
2091	<b>pcDNA3-HA E4orf3/4 del53-61aa</b>	pcDNA3flu	Ad5 E4orf3/4 del53-61aa	diese Arbeit
2092	<b>pcDNA3-HA E4orf3/4 del44-61aa</b>	pcDNA3flu	Ad5 E4orf3/4 del44-61aa	diese Arbeit
2159	<b>LeGO-iCer2_E4orf3</b>	LeGO-iCer2	Ad5 E4orf3	diese Arbeit
2163	<b>LeGO-iCer2_E4orf3/4</b>	LeGO-iCer2	Ad5 E4orf3/4	diese Arbeit

### 3.3.4 E4-Box Plasmide

Folgende Plasmide wurden im Rahmen der Arbeit zur direkten Klonierung von Ad5 Virusmutanten verwendet bzw. hergestellt. In der ersten Spalte angegeben ist die Nummer des Plasmids in der *FileMaker Pro*-Datenbank der Arbeitsgruppe.

#	BEZEICHNUNG	VERWENDUNG	REFERENZ
1155	<b>E4-Box-S2</b>	Mutagenese	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1740	<b>E4-Box E4orf4- (ATG-)</b>	Direkte Klonierung zur Herstellung einer E4orf4-negativen Virusmutante.	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1763	<b>E4-Box E4orf3- neu</b>	Direkte Klonierung zur Herstellung einer E4orf3-negativen Virusmutante	diese Arbeit
1780	<b>E4-Box E4orf3/4 NoDo</b>	Direkte Klonierung zur Herstellung einer E4orf3/4-negativen Virusmutante.	diese Arbeit
1781	<b>E4-Box E4orf3- 3/4 NoDo</b>	Direkte Klonierung zur Herstellung einer E4orf3- & 3/4-negativen Virusmutante.	diese Arbeit
1867	<b>E4-Box E4orf4- orf3-</b>	Direkte Klonierung zur Herstellung einer E4orf3- & 4-negativen Virusmutante.	diese Arbeit

## MATERIAL

1868	<b>E4-Box E4orf4- orf3/4-</b>	Direkte Klonierung zur Herstellung einer E4orf4- & 3/4-negativen Virusmutante.	diese Arbeit
1869	<b>E4-Box E4orf3- orf4- orf3/4-</b>	Direkte Klonierung zur Herstellung einer E4orf3-, E4orf4- & 3/4-negativen Virusmutante.	diese Arbeit
2188	<b>E4-Box Flag-E4orf3 Flag-E4orf3/4</b>	Direkte Klonierung zur Herstellung einer E4orf3 & E4orf3/4 N-terminal FLAG-tag fusionierten Virusmutante.	diese Arbeit
2189	<b>E4-Box E4orf3- Flag-E4orf3/4</b>	Direkte Klonierung zur Herstellung einer E4orf3-negativen, E4orf3/4 N-terminal FLAG-tag fusionierten Virusmutante.	diese Arbeit
2190	<b>E4-Box Flag+ E4orf3- E4orf3/4-</b>	Direkte Klonierung zur Herstellung einer E4orf3- & E4orf3/4-negativen, N-terminal FLAG-tag fusionierten Virusmutante.	diese Arbeit
2292	<b>E4-Box Flag-E4orf3 E4orf3/4-</b>	Direkte Klonierung zur Herstellung einer E4orf3/4- negativen, E4orf3 N-terminal FLAG-tag fusionierten Virusmutante.	diese Arbeit

### 3.3.5 Bacmide

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

#	BEZEICHNUNG	VERWENDUNG	REFERENZ
1154	<b>Ad5pPG-S2 (Noah)</b>	Direkte Klonierung zur Herstellung neuer Virusmutanten.	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1703	<b>Ad5pPG-S2 GFP-E4orf4</b>	Herstellung einer E4orf4-GFP fusionierten Virusmutante.	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1769	<b>Ad5pPG-S2 E4orf3- neu</b>	Herstellung einer E4orf3- negativen Virusmutante.	diese Arbeit
1788	<b>Ad5pPG-S2 E4orf3/4 NoDo</b>	Herstellung einer E4orf3/4-negativen Virusmutante.	diese Arbeit
1789	<b>Ad5pPG-S2 E4orf3- 3/4 NoDo</b>	Herstellung einer E4orf3- u. E4orf3/4-negativen Virusmutante.	diese Arbeit

## MATERIAL

1870	Ad5pPG-S2 E4orf3 <sup>-</sup> orf4 <sup>-</sup>	Herstellung einer E4orf3- u. E4orf4-negativen Virusmutante.	diese Arbeit
1871	Ad5pPG-S2 E4orf4 <sup>-</sup> orf3/4 <sup>-</sup>	Herstellung einer E4orf4- u. E4orf3/4-negativen Virusmutante.	diese Arbeit
1872	Ad5pPG-S2 E4orf3 <sup>-</sup> orf4 <sup>-</sup> orf3/4 <sup>-</sup>	Herstellung einer E4orf3-, E4orf4- u. E4orf3/4-negativen Virusmutante.	diese Arbeit
2293	Ad5pPG-S2 Flag-E4orf3 Flag-E4orf3/4	Herstellung einer E4orf3 u. E4orf3/4 N-terminal FLAG- <i>tag</i> fusionierten Virusmutante.	diese Arbeit
2294	Ad5pPG-S2 E4orf3 <sup>-</sup> Flag-E4orf3/4	Herstellung einer E4orf3- negativen, E4orf3/4 N-terminal FLAG- <i>tag</i> fusionierten Virusmutante.	diese Arbeit
2295	Ad5pPG-S2 Flag-E4orf3 E4orf3/4 <sup>-</sup>	Herstellung einer E4orf3/4- negativen, E4orf3 N-terminal FLAG- <i>tag</i> fusionierten Virusmutante.	diese Arbeit
2296	Ad5pPG-S2 Flag <sup>+</sup> E4orf3 <sup>-</sup> E4orf3/4 <sup>-</sup>	Herstellung einer E4orf3- u. E4orf3/4-negativen, N-terminal FLAG- <i>tag</i> fusionierten Virusmutante.	diese Arbeit

### 3.4 Antikörper

#### 3.4.1 Primärantikörper

BEZEICHNUNG	EIGENSCHAFTEN
<b>α-E1A M73</b>	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen E1A-Proteine (E1A-12S und E1A-13S) von Ad5 (Harlow <i>et al.</i> , 1985).
<b>α-E1B-55K 2A6</b>	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das E1B-55K-Protein von Ad5 (Sarnow <i>et al.</i> , 1982b).
<b>α-E1B-55K 4E8</b>	Monoklonaler Ratten-Antikörper gegen das E1B-55K-Protein von Ad5 (Kindsmüller <i>et al.</i> , 2009).
<b>α-E2A B6-8</b>	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das E2A-Protein von Ad5 (Reich <i>et al.</i> , 1983).
<b>α-E4orf3 6A11</b>	Monoklonaler Ratten-Antikörper gegen das E4orf3-Protein von Ad5 (Nevels <i>et al.</i> , 1999b).
<b>α-E4orf6 1807</b>	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das E4orf6-Protein von Ad5 (Boivin <i>et al.</i> , 1999).

## MATERIAL

---

---

<b><math>\alpha</math>-E4orf4 2419</b>	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das E4orf4-Protein von Ad5 (Lavoie <i>et al.</i> , 2000).
<b><math>\alpha</math>-E4orf6 RSA3</b>	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen den Aminoterminus des E4orf6- und E4orf6/7-Proteins von Ad5 (Marton <i>et al.</i> , 1990).
<b><math>\alpha</math>-L4-100K 6B10</b>	Monoklonaler Ratten-Antikörper gegen das L4-100K-Protein von Ad5 (Kzhyshkowska <i>et al.</i> , 2004).
<b><math>\alpha</math>-late (L133)</b>	Polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen späte Strukturproteine von Ad5 (Kindsmüller <i>et al.</i> , 2007).
<b><math>\beta</math>-Aktin (AC-15)</b>	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen $\beta$ -Aktin (Sigma, Katalog-Nummer: A5441).
<b><math>\alpha</math>-FLAG M2</b>	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das FLAG-Epitop (Sigma, Katalog-Nummer: F3165).
<b><math>\alpha</math>-GFP</b>	Monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Volllänge GFP ( <i>green fluorescent protein</i> ; Santa Cruz Biotechnology, Katalog-Nummer: sc8334).
<b><math>\alpha</math>-HA</b>	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das HA-Epitop (Covance, Katalog-Nummer: PRB-101P).
<b><math>\alpha</math>-HA 3F10</b>	Monoklonaler Ratten-Antikörper gegen das HA-Epitop (Roche, Katalog Nummer: 2013819).
<b><math>\alpha</math>-Mre11</b>	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das humane Mre11-Protein (Novus Biologicals, Inc, Katalog-Nummer: pNB 100-142).
<b><math>\alpha</math>-p53 (DO-1)</b>	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen ein aminotermiales 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
<b>HRP-Anti-Maus IgG</b>	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> , HRP) gekoppelter Antikörper gegen Maus IgGs aus Schaf (GE Healthcare).
<b>HRP-Anti-Ratte IgG</b>	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> , HRP) gekoppelter Antikörper gegen Ratte IgGs aus Ziege (GE Healthcare).
<b>HRP-Anti-Kaninchen IgG</b>	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> , HRP) gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen IgGs aus Esel (GE Healthcare).

---

## MATERIAL

Folgende Sekundärantikörper wurden für Immunfluoreszenzanalysen verwendet:

BEZEICHNUNG	EIGENSCHAFTEN
<b>FITC-Anti-Ratte IgG</b>	Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-gekoppelter Antikörper gegen Ratte IgGs aus Esel; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (H + L; Dianova).
<b>FITC-Anti-Maus IgG</b>	Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-gekoppelter Antikörper gegen Maus IgGs aus Esel; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (H + L; Dianova).
<b>FITC-Anti-Kaninchen IgG</b>	Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen IgGs aus Esel; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (H + L; Dianova).
<b>Cy<sup>TM</sup>3-Anti-Ratte IgG</b>	Cy <sup>TM</sup> 3 (Cy3)-gekoppelter Antikörper gegen Ratte IgGs aus Esel; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (H + L; Dianova).
<b>Cy<sup>TM</sup>3-Anti-Maus IgG</b>	Cy <sup>TM</sup> 3 (Cy3)-gekoppelter Antikörper gegen Maus IgGs aus Esel; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (H + L; Dianova).
<b>Alexa<sup>TM</sup> 488 Anti-Maus IgG</b>	Alexa <sup>TM</sup> 488 Antikörper gegen Maus IgGs aus Ziege (H + L; F(ab') <sub>2</sub> Fragment; Invitrogen).

### 3.5 Kommerzielle Systeme

Folgende kommerzielle Systeme wurden verwendet:

BEZEICHNUNG	HERSTELLER
<b>Plasmid Purification Mini, Midi und Maxi Kit</b>	Qiagen
<b>Protein Assay</b>	BioRad
<b>QuikChange<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit</b>	Stratagene (Agilent)
<b>RNeasy Mini Kit</b>	Qiagen
<b>Reverse Transcription System</b>	Promega
<b>SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate</b>	Pierce
<b>Yeast Plasmid Preparation Kit</b>	Zymo Research

### **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* (NEB) verwendet. Für die Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen bei der SDS-Gelelektrophorese wurde der *PageRuler™ 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 *Microsoft Office XP Professional* (Microsoft) auf einem PC erstellt. Zeichnungen, Diagramme und Abbildungen wurden mit den Programmen *Adobe Photoshop CS2* (Adobe) und *Adobe Illustrator CS2* (Adobe) angefertigt. Sequenzvergleiche wurden mit den Programmen *BioEdit 4.8.5* sowie der *CLC Workbench 5* (CLC Bio) erzeugt. 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 *FileMaker Pro 8.5* verwendet.

Zur Auswertung der laserkonfokalmikroskopischen Aufnahmen wurde die Software *LSM-FCS Verion 3.2* von Carl Zeiss verwendet. Für die Identifikation von potenziellen Protein-Interaktionspartner auf DNA-Ebene wurde das *online* zugängliche Programm *NCBI Blast*

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) zum Vergleich einer gefundenen DNA-Sequenz gegen eine Datenbank mit DNA-Sequenzen bekannter Proteine 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 9.0* 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, 4 °C; Kühlzentrifuge 5417 R, Eppendorf GmbH). Das Pellet wurde in 0,5 ml LB-Medium resuspendiert und in *CryoPure Tubes* (Sarstedt) mit 0,5 ml sterilem Glycerin gemischt. Diese Dauerkulturen sind nahezu unbegrenzt bei -80 °C haltbar.

<b>LB-Medium</b>	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	5 g/l
	• autoklavieren	
<b>Antibiotika-Stammlösungen</b>	Ampicillin (500x)	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub> .
	• 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 und Schimke, 1996). 1 L YENB-Medium wurde mit 10 ml einer frischen Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> 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 Bakterienpellet wurde daraufhin zweimal mit 100 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> 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 h bei 37 °C und 220 UpM geschüttelt. Anschließend wurden sie abzentrifugiert (4000 UpM, 10 min, RT; 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	7,5 g/l
		Bacto Nutrient Broth	8 g/l
		• autoklavieren	

### 4.1.2.2 Chemische Transformation von *E. coli*

Zur Transformation wurden chemisch-kompetente DH5α oder superkompetente XL2-Blue (Stratagene) *E. coli* Stämme zunächst auf Eis aufgetaut und ein Aliquot von 50 – 100 µl in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße transferiert, mit 2 µl β-Mercaptoethanol (1,22 M), sowie 1 - 10 µg Plasmid-DNA vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 s bei 42 °C wurden die Bakterien 2 min auf Eis abgekühlt und danach mit 500 µl 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, RT; Kühlzentrifuge 5417 R, Eppendorf GmbH) und in 50 µl LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika resuspendiert. Anschließend wurde der Ansatz auf LB-Agarplatten mit geeigneten Antibiotika ausplattiert.

<b>SOC-Medium</b>	Trypton	20 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	MgSO <sub>4</sub>	10 mM
	Glukose	20 mM
	• autoklavieren	
<b>NZCYM</b>	NZ Amin	10 g/l
	NaCl	0,5 g/l
	Hefeextrakt	0,2 g/l
	MgSO <sub>4</sub> x 6 H <sub>2</sub> 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 und Freeman, 1959). Das Medium wurde mit 5% oder 10% fötalem Kälberserum (FKS; PAN) angereichert und mit 1% einer Penicillin/Streptomycin-Lösung (1000 U/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin in 0,9% NaCl; PAA) versetzt. Die Zellen wurden bei 37 °C in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (Heraeus) mit 5%iger CO<sub>2</sub>-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, RT; Multifuge 3S-R, Heraeus). 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-Lösung vermischt. In ein Haemazytometer (Zell-Zählkammer; Neubauer *improved*, Thermo) wurde ein Tropfen dieser Flüssigkeit überführt. Die genaue Zellzahl wurde durch Auszählen von 16 Kleinquadraten des kammereigenen Rasters im Lichtmikroskop (Leica DMIL) und anschließender Berechnung mit der Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{gezählte Zellen} \times 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10^4 \text{ ermittelt.}$$

<b>PBS (pH 7,3)</b>	NaCl	140 mM
	KCl	3 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>	1,5 mM
	• autoklavieren	
<b>Trypanblau-Lösung</b>	Trypanblau	0,15%
	NaCl in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>	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 semi-sterilen Bedingungen entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) mit sterilem PBS bei RT aufbewahrt. Die Nieren wurden dann mit Pinzette und Skalpell in einer Petrischale mit sterilem PBS mechanisch zerkleinert und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Je 20 Nieren wurden in 20 ml sterilem PBS mit 1 mg/ml Kollagenase/Dispase-Mix (Roche) bei 37 °C für 3 - 4 h unter mehrmaligem Schütteln im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Nach Zentrifugation (2000 UpM, 10 min, RT; Multifuge 3S-R, Heraeus) 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 ausgebracht und im CO<sub>2</sub>-Brutschrank (Heraeus) in

---

---

5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag 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, RT; Multifuge 3S-R, Heraeus) und das Zellpellet in 1 ml FKS (PAN) mit 10% DMSO (Sigma) resuspendiert und in *CryoPure Tubes* (Sarstedt) überführt. Die Kühlung der Zellen erfolgte mit Hilfe des Cryo-Einfriergeräts "Mr. Frosty" (Nalgene) 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 Auf Polyethylenimin (PEI-) basierende 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, die DNA wird freigesetzt, transkribiert und translatiert. Adhärente Zellen wurden in Kulturschalen mit sechs Vertiefungen (*6-well* Schale; Sarstedt) oder Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 100 mm bzw. 150 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 Mischen 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 (DMEM, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin) ersetzt. Die transfizierten Zellen konnten 24 bis

72 h p.t. geerntet werden. PEI wurde zuvor in H<sub>2</sub>O. 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 kann bei -80 °C bis zu 6 Monaten aufbewahrt werden.

#### **4.2.4.2 Auf Liposomen basierende Methode**

Um sehr große DNA-Mengen bzw. sehr große DNA-Moleküle (ca. 36 kbp, z. B. Bacmide) in eukaryotische Zellen zu transfizieren wurde das Lipofectamin-Transfektionssystem von Invitrogen benutzt (*Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 reagent*). Das Prinzip dieser Methode beruht auf Zusammenlagerung von positiv geladenen kationischen Lipiden zu Liposomen bzw. kleinen Vesikeln, welche die negativ geladene DNA umschließen. Diese Lipid-DNA-Komplexe fusionieren anschließend mit der Zellmembran und ermöglichen somit den Transport der DNA in die Zellen. 24 h vor der Transfektion wurden adhärenente Zellen in einer 6-well Schale oder Zellkulturschalen 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. 24 - 72 h p.t. wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen (4.7.1) und für SDS-PAGE (4.7.3) verwendet.

#### **4.2.4.3 Auf Lentiviren basierende 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 sich 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 Tochterzellen.

##### *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 (replikations-inkompetent), so dass der Vektor selbst keine viralen Proteine produzieren kann. An Stelle der deletierten Sequenzen wurden die Sequenzen entweder für Ad5 E1 Proteine (E1A oder E1B-55K) oder E4-Proteine (E4orf3; E4orf4; E4orf3/4) 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 speziess- und gewebsübergreifende Infektion von Zellen zu ermöglichen. Das Plasmid pRSV-Rev kodiert für das Rev-Protein, 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, Ad5 E4orf3, Ad5 E4orf4, Ad5 E4orf3/4), die von den HEK 293T-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 ( $5 \times 10^4$ ) auf einer 24-well Zellkulturplatte ausgesät. Nach Absetzen der adhären Zellen auf dem Kulturplattenboden (nach ca. 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 transduziert. Eine nicht-transduzierte 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

wurde durch Zugabe von 0,5 ml Vollmedium (DMEM, 10% FKS, 1% Penicillin/ Streptomycin) gestoppt. Die abgelösten Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (2000 UpM, 3 min, RT; Kühlzentrifuge 5417 R, Eppendorf GmbH). Das Pellet wurde in 0,2 ml sterilem PBS resuspendiert und in ein Rundbodenröhrchen mit Filterdeckel (Falcon) überführt, wobei die Suspension durch den Filter gepresst und die Zellen vereinzelt wurden. 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 eine 6-well Zellkulturschale ausgesät. Unmittelbar vor der Infektion wurde das Nährmedium auf Infektionsmedium (DMEM, 10% FKS, Polybren 8 µg/ml) gewechselt. 10<sup>5</sup> virale Partikel wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt) pipettiert und mit Nährmedium (DMEM, 10% FKS, Polybren 8 µg/ml) auf 1,5 ml aufgefüllt und zu den 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 Plastischabers (Sarstedt) vom Boden der jeweiligen Zellkulturschale abgeschabt, in ein geeignetes Zentrifugenröhrchen überführt und bei Raumtemperatur zentrifugiert (2000 UpM, 3 min, 4 °C; Multifuge 3S-R, Heraeus). Es folgte ein Waschschrift mit 5 ml PBS und anschließender erneuter Zentrifugation (2000 UpM, 3 min, 4 °C). Das erhaltene Zellpellet wurde entweder bei -80 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

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

Dazu wurden primäre Rattennierenzellen (pBRK), die zwei Tage vor Versuchsbeginn kultiviert wurden (4.2.2), auf 100 mm-Zellkulturschalen mit Vollmedium (DMEM, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin) ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen wie unter 4.2.4.1 beschrieben transfiziert. Nach etwa drei Wochen starben die meisten nicht-transfizierten Zellen

ab, wohingegen Zellen, in denen die adenoviralen Genprodukte exprimiert und die Zellen dadurch transformiert wurden, zu mehrschichtigen Zellkolonien (*Foci*) auswuchsen. Diese konnten mit einer Kristallviolett-Färbelösung angefärbt und ausgezählt werden. Dabei bildet die Anzahl der *Foci* ein Maß für die Effizienz mit der zelluläre und virale Onkogene den Transformationsprozess initiieren können.

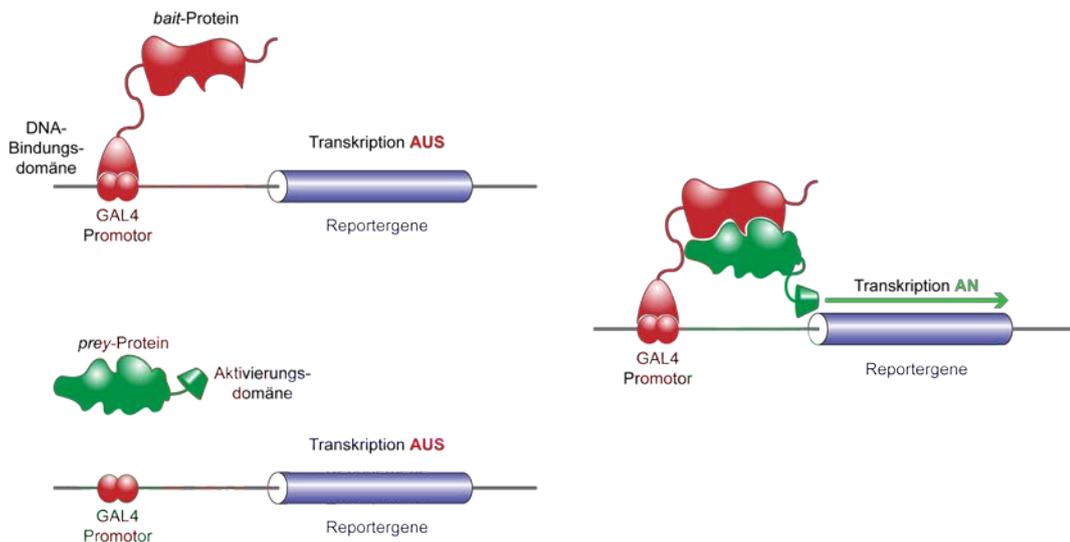
<b>Kristallviolett-Färbelösung</b>		Kristallviolett	1% (w/v)
		Methanol	25% (v/v)
		• in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>	

### 4.3 Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Zwei-Hybrid-System ist eine Methode zum Nachweis und zur Untersuchung spezifischer Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* (Fields und Song, 1989; Chien *et al.*, 1991). Die Grundlage des Systems bildet die strukturelle Flexibilität des Hefe-Transkriptionsfaktors GAL4, der in zwei funktionelle Domänen unterteilt wird. Die N-terminale DNA-Bindungsdomäne (GAL4 DNA-BD) bindet dabei direkt an den DNA Promotor während die C-terminale Aktivierungsdomäne (GAL4 AD) die Transkription des Gens aktiviert. Die beiden Domänen müssen nicht kovalent verbunden sein, sind jedoch einzeln nicht funktionsfähig (Abb. 7). Die räumliche Nähe der Domänen zueinander kann ausreichen um die Funktion als Transkriptionsfaktor wiederherzustellen. GAL4 bindet an ein GAL-responsives Element (z. B. GAL1) und aktiviert die Transkription von Genen, die für den Galaktose-Metabolismus benötigt werden (Johnston und Hopper, 1982). In die Hefestämme, die im Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendet werden, wurden Reportergene mit den entsprechenden Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor GAL4 eingeschleust. Diese Promotorregion, die ursprünglich die Gene für den Galaktose-Metabolismus reguliert, ist im Wesentlichen aus der UAS (*upstream activating sequence*) und der TATA-Region aufgebaut. Die Expression der Reportergene wird ausschließlich durch eine Protein-Protein-Wechselwirkung hervorgerufen und verleiht den Hefezellen zusätzliche Eigenschaften. Die Reportergene unterteilen sich in auxotrophe und chromogene Reporter. Durch die auxotrophen Reporter werden Histidin und Tryptophan von den Hefezellen synthetisiert, so dass diese im Medium ohne Histidin und Tryptophan wachsen können. Bei der Aktivierung der chromogenen Reporter werden die Enzyme  $\beta$ - (*lacZ*) und  $\alpha$ - (*MEL1*) Galaktosidase synthetisiert, die das farblose Substrat X-Gal in ein blaugefärbtes Produkt (Indigo) umsetzen (4.3.3).

Ein *bait*-Protein (Köderprotein) wird mit der DNA-Bindungsdomäne, ein *prey*-Protein (Beuteprotein) mit der Transkriptions-Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors GAL4 fusioniert. Die Reportergene mit dem GAL4 Promotor wurden in die Hefezellen entweder mit einem Plasmid eingebracht oder in das Genom integriert. Die Fusionsproteine alleine sollten die Transkription der Reportergene nicht aktivieren (Abb. 7). Nur im Falle einer Interaktion zwischen dem *bait*- und *prey*-Protein rekonstituieren die Bindungs- und Aktivierungsdomäne einen funktionellen Transkriptionsfaktor und die Reportergene werden exprimiert.

Das in dieser Arbeit verwendete Hefe-System zur Identifikation zellulärer Interaktionspartner des adenoviralen Proteins E4orf3/4 basiert im Wesentlichen auf dem *Matchmaker Two-Hybrid System 3* (Clontech). Der GAL4-Transkriptionsfaktor setzt sich aus einer DNA-Bindungsdomäne (GAL4 DNA-BD), kodiert von dem Expressionsvektor pGBKT7 und einer Transkriptions-Aktivierungsdomäne (GAL4 AD), kodiert durch pGADT7, zusammen. Das zu untersuchende *bait*-Protein ("Köderprotein" bzw. Suchprotein) wird als Fusionsprotein mit GAL4 DNA-BD und das *prey*-Protein ("Beuteprotein" bzw. Interaktor) als Fusionsprotein mit GAL4 AD exprimiert (3.3.3).



**Abb. 7 Funktionsprinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems**

Weder das *bait*- noch das *prey*-Fusionsprotein alleine aktivieren die Transkription der Reportergene. Werden beide Proteine in einer Hefezelle exprimiert und binden aneinander, fügen sich die beiden Domänen des GAL4 zu einem funktionellen Transkriptionsfaktor zusammen.

### 4.3.1 Transformation von Hefezellen

Die jeweiligen Hefestämme (Y153-Hefe; 3.1.2) wurden entsprechend der Lithiumacetat (LiAc) Methode (*Yeast Protocols Handbook*, Clontech) transformiert. Hierbei wurden die Hefezellen

über Nacht (16 – 18 h) bei 30 °C im Schüttelinkubator (New Brunswick) in 10 ml YPAD-Vollmedium angezüchtet. Nach Erreichen der stationären Phase ( $OD_{600} = 10$ ) wurde die Hefesuspension in 300 ml YPAD-Medium überführt und weitere 5 – 7 h unter Schütteln inkubiert um die logarithmische Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,7 - 0,9$ ) zu erreichen. Nach Zentrifugation (2000 UpM, 5 min, RT; Multifuge 3S-R, Heraeus) wurden die Zellen in 10 ml  $H_2O_{bid.}$  resuspendiert und erneut zentrifugiert (2000 UpM, 5 min, RT). Insgesamt wurde dreimal mit  $H_2O_{bid.}$  und anschließend einmal mit 20 ml 100 mM LiAc-Lösung gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml 100 mM LiAc-Lösung resuspendiert. Für die Transformation wurden 0,1 ml dieser Zellsuspension mit 2 – 5 µg Plasmid-DNA und 0,1 mg *Carrier*-DNA (gescherte Heringssperma-DNA) gemischt. Die Suspension wurde mit 0,6 ml Polyethylenglykol-Lithiumacetat-Lösung (PEG/LiAc-Lsg.) bei 30 °C und 200 UpM für 45 min inkubiert, nachfolgend mit 70 µl DMSO versetzt und 15 min bei 45 °C (Hitzeschock) inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (4000 UpM, 5 min, RT; Kühlzentrifuge 5417 R, Eppendorf GmbH) wurden die Hefezellen in 0,2 ml  $H_2O_{bid.}$  aufgenommen und zur Selektion transformierter Zellen auf W-Platten (ohne Tryptophan) ausgekugelt (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) (Golemis und Khazak, 1997). Das verwendete Plasmid (#1923; 3.3.3) kodiert neben dem adenoviralen Suchprotein Ad5 E4orf3/4 auch für TRP1, das den transformierten Y153-Hefen ein Wachstum in Tryptophan-freiem Medium ermöglicht. Die Platten wurden 3 - 4 Tage bei 30 °C inkubiert, wobei erste Kolonien nach 48 h sichtbar wurden. Für den Suchansatz wurden 10 ml YAPD Medium mit 10 µl transformierter Hefesuspension (4.5.1; #1923) angeimpft und über Nacht bis zum Erreichen der stationäre Phase ( $OD_{600} = 10$ ) inkubiert. Danach wurden die Suspensionen 1:1000 verdünnt und bei 30 °C und 220 UpM bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,7 - 0,9 inkubiert und wie oben bereits beschrieben, erneut transformiert. Zur Selektion zweifach transformierter Hefen wurden diese nach dem Hitzeschock (15 min bei 45 °C) abzentrifugiert (4000 UpM, 5 min, RT), in 0,2 ml  $H_2O_{bid.}$  resuspendiert und auf HWL- 20 mAT-Platten (ohne Histidin, Tryptophan und Leucin; mit Aminotriazol) ausgekugelt (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) und anschließend 1 - 2 Wochen bei 30 °C inkubiert. Das Aminotriazol hemmt die Hintergrundaktivität der Histidinsynthese von nicht transformierten Zellen. Die hier transformierte humane Genbank (pACT; 3.3.2) kodiert die cDNAs EBV-transformierter humaner peripherer Lymphozyten sowie den Faktor LEU2, der es den Hefen ermöglicht auf Leucin-freiem Medium zu wachsen. Durch die Interaktion eines dieser Proteine mit dem Ad5 E4orf3/4-Protein wird ein funktioneller Transkriptionsaktivator gebildet, der die Synthese von Histidin und somit ein Wachstum auf His-freiem Medium ermöglicht.

## METHODEN

<b>YAPD-Medium:</b>	Bacto Yeast Extrakt Bacto Pepton 20% Glucose-Lsg. (nach dem Autoklavieren) • autoklavieren	10 g/l 20 g/l 50 ml/l
<b>20% Glucose-Lsg.</b>	Glucose H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> • steril filtrieren	100 g ad 500 ml
<b>10x Lithiumacetat-Lsg. (LiAc):</b>	Lithiumacetat H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> • 1M, pH 8,5, sterilfiltriert	10,2 g ad 100 ml
<b>50% PEG-Lsg.</b>	Polyethylenglycol 3350 (Sigma P3640) H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> • steril filtrieren	200 g ad 400 ml
<b>PEG/LiAc-Lsg.</b>	1M LiAc 50% PEG-Lösung H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>	1 ml 8 ml 1 ml
<b>Plattenmedium HWL-</b>	10x YNB ( <i>yeast nitrogen base</i> ) Glucose 20x Aminosäure-Mix HWL- 100x Uracil Bacto Agar H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> • steril filtrieren	50 ml 50 ml 25 ml 5 ml 10 g ad 500 ml
<b>20x Aminosäure-Mix HWL-</b>	Adenin (Sigma A9126) Arginin (Sigma A5131) Asparagin (Sigma A8381) Glutamin (Sigma G1501) Isoleucin (Sigma I2752) Lysin (Sigma L5501) Methionin (Sigma M9625) Phenylalanin (Sigma P2126) Serin (Sigma S8407) Threonin (Sigma T8625) Thyrosin (Sigma T3754) Valin (Sigma V0500) H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> • steril filtrieren	0,9 g 0,432 g 2,16 g 2,16 g 0,648 g 0,648 g 0,432 g 1,08 g 7,92 g 4,32 g 0,648 g 3,24 g ad 900 ml
<b>200x Histidin-Lsg.</b>	Histidin (Sigma H8125) H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> • steril filtrieren	0,48 g ad 100 ml
<b>200x Leucin-Lsg.</b>	Leucin (Sigma L8000) H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> • steril filtrieren	1,44 g ad 100 ml
<b>200x Tryptophan-Lsg.</b>	Tryptophan (Sigma T0254) H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> • steril filtrieren	0,96 g ad 100 ml

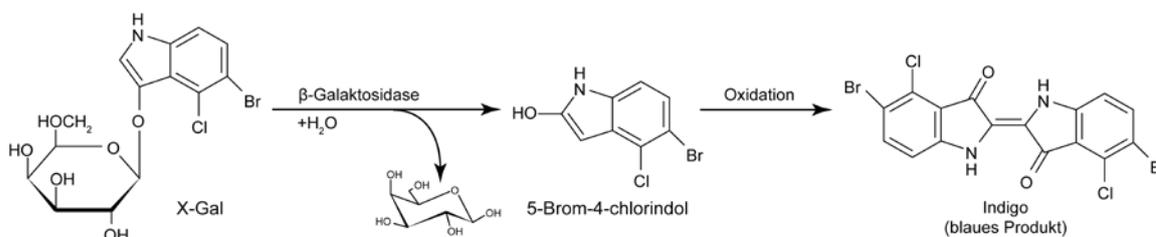
100x Uracil-Lsg.

Uracil (Sigma U0750)  
 H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>  
 • steril filtrieren

0,24 g  
 ad 100 ml

### 4.3.2 $\beta$ -Galaktosidase *Filter-Lift Assay*

Die zweifach transformierten Hefezellen wurden auf Minimalplatten (HWL- 20 mAT-Platten) ausgestrichen. Die Zellen, die unter diesen Selektionsbedingungen gewachsen sind, wurden anschließend in einem  $\beta$ -Galaktosidase *Filter-Lift Assay* analysiert. Die Grundlage bildet hierbei das *lacZ*-Reportergen, welches ebenfalls unter der Kontrolle des GAL4-Transkriptionsfaktors steht, das für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase kodiert. Dieses Enzym setzt das farblose Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) zu 5-Brom-4-chlorindol um, das nach Oxidation einen blauen Indigo-Komplex liefert (Abb. 8).



**Abb. 8 Die  $\beta$ -Galaktosidase-Reaktion**

Eine aktive  $\beta$ -Galaktosidase spaltet vom Substrat X-Gal das Aglykon (5-Brom-4-chlorindol) ab. In einer folgenden Oxidationsreaktion entsteht daraus blaues Indigo.

Zunächst wurden die Hefen auf Selektionsplatten (HWL- 20 mAT-Platten) ausgestrichen und 3 - 4 Tage bei 30 °C inkubiert. Auf diese Selektionsplatten wurde eine trockene Nylon-Membran gedrückt um die Kolonien von der Platte auf den Filter zu übertragen. Um die Zellen auf dem abgezogenen Filter aufzuschließen, wurde der Filter eingefroren und anschließend wieder aufgetaut. Dazu wurde der Filter für ca. 10 s in flüssigen Stickstoff getaucht um ihn danach bei Raumtemperatur wieder vollständig auftauen zu lassen. Mit der Kolonien-tragenden Seite nach oben wurde der Filter in 750  $\mu$ l einer Z-Puffer/X-Gal-Lösung gelegt und so das Substrat X-Gal von der in den Zellen vorhandenen  $\beta$ -Galaktosidase umgesetzt. Nach einer 60-minütigen Inkubationszeit bei 30 °C konnte eine Blaufärbung der Kolonien detektiert werden.

<b>Z-Puffer (pH 7,0)</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	60 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	40 mM
	KCl	10 mM
	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1 mM
	H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> ad 1 l	
	pH sollte bei 7,0 liegen	
	• autoklavieren	
<b>X-Gal (Stammlösung)</b>	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid	5% (w/v)
	in N,N-Dimethylformamid (DMF)	
	⇒ c = 20 mg/ml	
<b>Z-Puffer/X-Gal Lösung</b>	Z-Puffer	100 ml
	β-Mercaptoethanol	0,3% (v/v)
	X-Gal (Stammlösung)	1,67 ml

### 4.3.3 Screening einer B-Zell cDNA Bibliothek

In einem *Screening*-Ansatz des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wurde E4orf3/4 als *bait* eingesetzt. Als *prey* diente in diesem Fall eine humane B-Zell cDNA-Bibliothek (pACT; 3.3.2). Der Hefestamm Y153 wurde mit dem pGBKT7-E4orf3/4-Konstrukt (#1923; 3.3.3) transformiert, auf W-Platten selektioniert und mittels eines *Filter-Lift Assays* (4.3.3) auf Autotransaktivierung der Reportergene getestet. Das Ergebnis war negativ und so konnten die einfach transformierten Hefen über eine erneute LiAc-Transformation mit einer Plasmid-basierten, humanen B-Zell-Genbank (Durfee *et al.*, 1993) zusammengebracht werden. Um die dabei vorliegende Transformationsrate zu bestimmen, wurden Aliquots des Transformationsansatzes verdünnt und auf WL-Platten ausplattiert. Die doppelt transformierten Hefen wurden nun auf HWL-Platten ausplattiert. Die Plasmide der Genbank enthalten als Auxotrophiemarker LEU2, was ein Wachstum auf Leucin-freien Nährmedien ermöglicht. Auf den Mangelmediumplatten wurde sowohl auf die Anwesenheit der Plasmide als auch - durch das Fehlen von Histidin - auf Protein-Protein-Interaktionen selektioniert. Gebildete Kolonien wurden anschließend in einen *Filter-Lift Assay* auf die Aktivität des zweiten Reportergens untersucht um zu zeigen, dass die jeweiligen Hefe-Klone aufgrund der Interaktion der beiden Fusionsproteine Histidin-prototroph sind und diese Eigenschaft nicht durch zufällige Mutation erworben haben. Aus den angewachsenen blaugefärbten Hefeklonen wurden die Plasmide, kodierend für potenzielle Interaktionspartner, isoliert und durch *XhoI*-Restriktionsanalyse, Sequenzierung und *NCBI Blast* (3.9) identifiziert.

### 4.3.4 Plasmid-DNA-Präparation aus Hefezellen

Zur Gewinnung von Plasmiden aus Hefe für die Transformation von *E. coli* wurde das *Yeast Plasmid Preparation Kit* (Zymo) verwendet. Es wurden 1 ml einer Hefekultur gemäß den Angaben des Herstellers aufgearbeitet und die isolierte DNA in 35 µl TE-Puffer aufgenommen.

TE-Puffer	Tris/HCl, pH 8,0	10 mM
	EDTA	1 mM

## 4.4 Adenoviren

### 4.4.1 Herstellung von Viruspartikeln aus DNA

Mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *PacI* (New England Biolabs) wurde der bakterielle Anteil von den adenoviralen DNA-Bacmiden entfernt. Die linearisierte DNA wurde mit  $1/10$  Vol. 3 M NaOAc und 1 Vol. Isopropanol gefällt und je 8 µg gespaltene Bacmid-DNA pro 50 mm-Zellkulturschale in 2E2-Zellen mit *Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000* (Invitrogen, 4.2.4.2) transfiziert. Nach ca. 6 h im CO<sub>2</sub>-Inkubator wurde das Medium gewechselt. Die transfizierten Zellen wurden solange weiterkultiviert bis sie sich vom Boden der Schale ablösten (jedoch maximal fünf Tage). Noch adhärente Zellen wurden mit einem Zellschaber abgeschabt, bei 2000 UpM für 5 min pelletiert (Multifuge 3S-R; Heraeus), 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 physikalisch aufgebrochen und abermals zentrifugiert (10 min, 4500 Upm, RT für; Multifuge 3S-R, Heraeus). Mit dem erhaltenen Überstand wurde erneut eine 50 mm-Zellkulturschale infiziert (4.4.5). 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 (4.4.2) benutzt werden.

#### 4.4.2 Herstellung und Lagerung hochtitriger Virusstocks

Zur Gewinnung hochtitriger Virusstocks wurden mehrere 150 mm-Zellkulturschalen entweder mit einer  $moi$  von 5 ffu/Zelle oder mit dem Überstand aus 4.4.1 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 in etwa 90% der produzierten Viren zellassoziiert bleiben (Jakoby, 1979) wurden die Zellen von der Unterlage abgeklopft und 5 min bei 2000 UpM zentrifugiert (Multifuge 3S-R, Heraeus). Das Pellet wurde in 5 ml PBS gewaschen und anschließend erneut zentrifugiert (2000 UpM, 5 min, RT; Multifuge 3S-R, Heraeus). Das Zellpellet, aus fünf 150 mm-Zellkulturschalen, wurde in 4 ml DMEM ohne Zusätze resuspendiert und die Zellen durch viermaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C lysiert. Zum Entfernen der Zelltrümmer wurde 15 min bei 4500 UpM zentrifugiert (Multifuge 3S-R, Heraeus). Anschließend wurde der Überstand abgenommen, mit 87%igem Glycerin (steril, 10% Endkonzentration; AppliChem) versetzt und dessen Titer bestimmt (4.4.4). Die Virusstocks wurden bei -80 °C gelagert werden.

#### 4.4.3 Reinigung und Konzentrierung von Viruspartikeln mit Hilfe der CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

Um reine virale DNA aus Ad5-Viruspartikel isolieren zu können, wurden mittels CsCl-Dichtegradientenzentrifugation infektiöse Viruspartikel gereinigt und aufkonzentriert. Zunächst wurden dazu 7 - 9 Zellkulturschalen ( $\varnothing$  150 mm) mit virusinfizierten Zellen, wie unter 4.2.5 beschrieben, geerntet. Die Zellpellets wurden in einer kleinen Menge PBS (ca. 5 ml) resuspendiert, vereinigt und erneut zentrifugiert (5 min, 2000 UpM, 4 °C; Multifuge 3S-R, Heraeus). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 7 ml HEPES-Lösung (100 mM, pH 7,4) resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend, wie unter 4.4.1 beschrieben über Einfrier- und Auftau-Zyklen, aufgebrochen. Die Zellbestandteile wurden pelletiert (4500 UpM, 10 min, 15 °C; Multifuge 3S-R, Heraeus) und der hochtitrige Überstand mit infektiösen Viruspartikeln vorsichtig in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) überführt. Anschließend wurden zwei dünnwandige 14 ml Polyacetylen-Zentrifugenröhrchen (Beckman & Coulter) mit je 2,5 ml einer CsCl-Lösung mit einer Dichte von 1,25 g/cm<sup>3</sup> (in HEPES 100 mM, pH 7,4 gelöst) befüllt. Danach wurde mit je 2 ml einer CsCl-Lösung mit einer Dichte von 1,4 g/cm<sup>3</sup> (in HEPES 100 mM, pH 7,4) vorsichtig unterschichtet um ein Vermischen der beiden CsCl-Lösungen zu verhindern. Die Phasengrenze der verschiedenen dichten CsCl-Lösungen wurde auf der Aus-

senwand des Röhrchens markiert. Als Nächstes wurde der virushaltige Überstand langsam auf die CsCl-Lösungen geladen und 180 min bei 28000 UpM und 15 °C (SW-28 Rotor, Optima™ L90-K Ultrazentrifuge, Beckman & Coulter) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation sollte eine milchig-weiße Virusbande oberhalb der zuvor angebrachten Markierung zu sehen sein. Mit einer sterilen 10 ml Pipette wurde der trübe Überstand bis zur Virusbande entfernt. Mit einer Mikroliterpipette (Pipetman 1000, Gilson) wurde die Virusbande abgezogen und in ein frisches 15 ml Falcon Röhrchen überführt. Das Volumen der gereinigten Viruspartikel wurde mit einer Pipette grob gemessen und mit fünf Volumen-Anteilen 1.2x-*Virus Storage Buffer* gemischt. Aliquotiert in 1,8 ml *CryoPure Tubes* (Sarstedt) kann der Virusstock über mehrere Jahre stabil bei -80 °C gelagert werden. Ein flüssiger Arbeitsstock kann für mehrere Monate bei -20°C aufbewahrt werden.

<b>HBS</b>	NaCl	137 mM
	KCl	3 mM
	Hepes, pH 7,4	25 mM
	• steril filtrieren	
<b>1.2x <i>Virus Storage Buffer</i></b>	NaCl	120 mM
	Hepes (pH 7,4)	12 mM
	BSA	0,1 mg/ml
	Glyzerin	50% (v/v)
	• steril filtrieren	

#### 4.4.4 Titerbestimmung von Virusstocks

Der Titer der verwendeten Virusstocks wurde mit Hilfe von fluoreszenzbildenden Einheiten (*fluorescence forming units*, ffu) bestimmt. Diese Methode konzentriert sich auf die frühen Infektionsereignisse, repräsentiert durch den immunhistochemischen Nachweis des frühen adenoviralen DNA-bindenden-Proteins (DBP; E2A). Dazu wurden je  $4 \times 10^5$  Zellen einer geeigneten Zelllinie (HEK 293 für Ad5 E1-Mutanten bzw. W162 für Ad5 E4-Mutanten) in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (6-*well* Schale) ausgesät. 24 h später wurde das Medium abgezogen, 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 CO<sub>2</sub>-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 CO<sub>2</sub>-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 (4.7.6.1). Danach wurde das Methanol 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  $\alpha$ -E2A 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 Antikörperverdünnung (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 Fluoreszenzlichtmikroskop (Leica DMIL) ausgezählt werden. Aus der pro Gesichtsfeld ermittelten Zahl infizierter Zellen, konnte unter Berücksichtigung der Zellzahl und der Verdünnungsstufe die Zahl der infektiösen Viruspartikel pro ml berechnet werden.

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

#### 4.4.5 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 100) mit einem geeigneten Volumen Medium (DMEM) ohne Zusätze gemischt und auf die Zellen gegeben. Für die Infektion einer *6-well* Schale benötigte man ein Gesamtvolumen von 1 ml, für Petrischalen wurden 5 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, 5% oder 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin) überschichtet.

Die infizierten Zellen wurden je nach Versuchsansatz 4 – 72 h entsprechend weiter inkubiert.

#### 4.4.6 Bestimmung und Ausbeute an Virusnachkommen

Um die Anzahl der Nachkommenviren zu bestimmen, wurden Zellen (A549) in 100 mm-Zellkulturschalen wie unter 4.4.5 beschrieben mit Ad5 infiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. Dazu wurden die Zellen mit Hilfe eines Plastikspatels vom Boden der Zellkulturschale abgeschabt, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) überführt und abzentrifugiert (2000 UpM, 3 min, 4 °C; Multifuge 3S-R, Heraeus). Das Zellpellet wurde mit 5 ml sterilem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (2000 UpM, 3 min, 4 °C). 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 aufgebrochen werden. Zum Entfernen der Zelltrümmer wurde erneut zentrifugiert (4500 UpM, 15 min, 4 °C). Der virushaltige Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und konnte bei 4 °C vorübergehend gelagert werden. Die Zahl der infektiösen Partikel im Überstand konnte wie unter 4.4.4 angegeben bestimmt werden. Aus dieser Zahl, dem Verdünnungsfaktor und der Anzahl der in dem Versuch eingesetzten Zellen konnte die Zahl der Nachkommenviren pro Zelle berechnet werden.

#### 4.4.7 Inhibition zellulärer 26S Proteasomen

26S Proteasomen sind hochselektive und hochmolekulare Proteinasekomplexe die sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern lokalisiert sind, und aus zwei Untereinheiten gebildet werden. Die zentrale 20S-Core-Einheit besteht aus 4 Ringen und besitzt proteolytische Aktivität, während die jeweils an den Enden sitzenden 19S-Einheiten eine regulatorische Aufgabe haben. Die 4 Ringe der Core-Einheit lassen sich in eine zentrale  $\beta$ -Einheit und zwei periphere  $\alpha$ -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 und Ciechanover, 1998). Das Tripeptidaldehyd MG-132 (Sigma) hemmt reversibel  $\beta 1$ - und  $\beta 2$ -Untereinheiten dieser Proteasomen und wirkt zusätzlich auf andere Proteasen der Zelle, wie Calpain und Cathepsin B. Zur Proteasomeninhibition wurde eine Transfektion (4.2.4.) oder Infektion (4.4.5) mit den entsprechenden Zellen durchgeführt. Vor der Zellernte wurde das Medium entfernt 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 Kontrollansätze 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* (4.7.4) weiteranalysiert.

## 4.5 DNA-Techniken

### 4.5.1 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 wurden 1,0 ml einer 5 ml-Übernachtskultur in ein 1,5 ml Reagiergefäß (Sarstedt) überführt, abzentrifugiert (3000 UpM, 3 min, 4 °C; Kühlzentrifuge 5417 R, Eppendorf GmbH), 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 R, Eppendorf GmbH) zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 600 µl Isopropanol zugegeben und die DNA 30 min bei 13 000 UpM (Kühlzentrifuge 5417 R; Eppendorf GmbH) gefällt. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Präzipitat mit 1 ml EtOH<sub>75%</sub> gewaschen, danach getrocknet und in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> gelöst. Die so isolierte DNA konnte für Restriktions- und Sequenzanalysen eingesetzt werden.

<b>Lösung A</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tris/HCl, pH 8,0</li> <li>EDTA</li> <li>RNAse A</li> <li>• Lagerung bei 4 °C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>50 mM</li> <li>10 mM</li> <li>100 µg/ml</li> </ul>
<b>Lösung B</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>NaOH</li> <li>SDS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>200 mM</li> <li>1% (w/v)</li> </ul>
<b>Lösung C</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ammoniumazetat</li> <li>• Lagerung bei 4 °C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>7,5 M</li> </ul>

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.

## 4.5.2 Extraktion viraler DNA aus Viruspartikeln

Um neu eingeführte Mutationen zu bestätigen, die virale DNA zu überprüfen und eventuell entstandene unerwünschte Veränderungen wie z. B. die Integration eines Transposons auszuschließen ist es notwendig, die virale DNA mittels geeigneter Restriktionsenzyme zu schneiden und zusätzlich zu sequenzieren. Hierzu wurde ein 0,5 - 1,0 ml Aliquot einer wie unter 4.4.3 beschrieben gereinigten Virus-Suspension gegen ein großes Volumen PBS (3 - 5 l), für mehrere Stunden bzw. über Nacht, dialysiert (*Slide-A-Lyser*<sup>®</sup>, PIERCE). Die PBS-Lösung sollte dabei mindestens zweimal gewechselt werden. Im Anschluss an die Dialyse wurde die Virussuspension in ein 1,5 ml Reagiergefäß (Sarstedt) überführt und Proteinase K (Endkonzentration von 200 µg/ml) und SDS (Endkonzentration von 0,5%) zugegeben. Zu diesem Ansatz wurden 500 - 1000 U RNase T<sub>1</sub> (Roche) pipettiert und für mindestens drei Stunden oder über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mit dem gesamten Ansatz eine PCI-Extraktion (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol = 25:24:1) in 2,0 ml *Phase-Lock Tubes* (Phase Lock Gel<sup>™</sup>, Heavy 2,0 ml; Eppendorf) durchgeführt. Der wässrige DNA-haltige Überstand wurde in ein frisches 2,0 ml Reagiergefäß (Sarstedt) überführt. Im Anschluss daran wurde <sup>1</sup>/<sub>10</sub> Vol. 3 M NaOAc und 1 Vol. Isopropanol zugegeben und 12 min mit 12000 UpM bei RT zentrifugiert, um die DNA zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) wieder in Lösung gebracht und die Konzentration wie unter 4.5.3 erklärt, gemessen. Die isolierte DNA wurde anschließend mit *Hind*III geschnitten und die Restriktionsfragmente in einem analytischen 0,6%-Agarosegel das 0,05 mg Ethidiumbromid/ml Gel-Lösung enthielt, wie 4.5.4 beschrieben, aufgetrennt. Das Restriktionsmuster wurde mit dem für Ad5 typischen Fragmentmuster verglichen und auf Deletionen oder Rearrangements überprüft. Für die Sequenzanalyse wurden 1 - 2 µg Virus-DNA und 15 - 25 pmol geeignete *Primer* verwendet.

## 4.5.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde mit Hilfe des *NanoDrop1000* (Thermo Scientific), oder 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 (1 cm Schichtdicke, *Smart Spec plus*) gegeben und ein UV-Absorptionsspektrum über einen festgelegten Wellenlängenbereich aufgenommen. Bei dsDNA entspricht eine Absorption von 1,0 im Absorptionsmaximum bei 260 nm einer

Konzentration von 50 µg/ml. Für einzelsträngige Oligonukleotide gilt die Näherungsformel 1 OD<sub>260</sub> = 33 µg/ml.

#### 4.5.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen beruht auf der unterschiedlichen Wandergeschwindigkeit von Nukleinsäurefragmenten im elektrischen Feld in Abhängigkeit von ihrer Länge. Zur Herstellung von Agarosegelen wurde eine entsprechende Menge LE-Agarose (Biozym) in einem Mikrowellenherd (Siemens) in 1x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und zur späteren Färbung der DNA 0,05 mg/ml Ethidiumbromid-Lösung (Sigma) hinzugefügt. Die auf Handwärme abgekühlte Agarose-Lösung wurde dann in eine vorbereitete Flachbettgelapparatur gegossen. Die DNA-Proben wurden mit jeweils 1/6 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 z. B. Ad5-Bacmiden, wurde bei präparativen Gelen zusätzlich 1 mM Guanosin der Gel-Lösung beigemischt.

<b>5 x TBE</b>	Tris	0,45 M
	Borsäure	0,45 M
	EDTA	10 mM
	• mit Eisessig auf pH 7,8 bringen	
<b>Auftragspuffer</b>	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
	Xylencyanol	0,25% (w/v)
	Glyzerin	50% (v/v)
	50x TAE	2% (v/v)

#### 4.5.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen erfolgte entweder mit Hilfe des *GeneJet Gel Extraction Kit* (Fermentas) 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 zu-

nächst unter langwelligem UV-Licht (365 nm) aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend für 2 h bei RT und 20000 UpM im SS34-Rotor (RC-5B *Plus*, Sorvall) zentrifugiert. Der wässrige DNA-haltige Überstand wurde dann mit  $1/10$  Vol. 3 M NaOAc und 1 Vol. Isopropanol gefällt, das DNA-Pellet in 40  $\mu$ l 10 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgenommen und die Konzentration und Qualität der isolierten DNA über erneute Agarose-Gelelektrophorese (4.5.4) eines Aliquots mit Hilfe des *G:Box Systems* (Syngene), abgeschätzt.

## 4.5.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

### 4.5.6.1 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  $\mu$ l Standard-Reaktionsansatz wurden 50 - 100 ng DNA, je 0,2  $\mu$ M der entsprechenden Oligonukleotidprimer, je 1  $\mu$ l dNTP-Mix (Desoxynukleotidphosphat-Mix; dATP, dGTP, dCTP, dTTP; New England Biolabs), 5  $\mu$ l 10x PCR-Puffer (Fermentas) und 0,5  $\mu$ l thermostabile *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l; *DreamTaq*; Fermentas) 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 - 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  $\mu$ l der so amplifizierten DNA wurden auf einem Agarosegel elektrophoretisch (4.5.4) aufgetrennt und unter UV-Licht hinsichtlich Fragmentgröße und Ausbeute mit Hilfe des *G:Box Systems* (Syngene) überprüft.

### 4.5.6.2 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 liegen, welche zusätzlich mit einem GC-reichen Abschnitt beginnen und enden sollte. Die Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden von der Firma Metabion synthetisiert. In die PCR wurden davon 125 ng eingesetzt. Die Mutagenese wurde in 0,2 ml PCR Reaktionsgefäßen (Biozym) angesetzt. Der Mix bestand aus 5 µl eines 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 einem *template* DNA Fragment (Matrize), in welches die Mutation eingeführt werden sollte. Der Ansatz wurde dann mit 1 µl *Pfu Ultra II* DNA-Polymerase (Stratagene) versetzt und mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> 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 der Ansatz für 3 h bei 37 °C mit 1 µl des Restriktionsenzym *DpnI* (New England Biolabs) inkubiert, um methylierte Elternstrang-DNA zu beseitigen. 5 µl der mutagenisierten DNA wurden auf einem Agarosegel elektrophoretisch (4.5.4) 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).

#### 4.5.6.3 PCR zum Nachweis der Virusreplikation

Aus einem 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 H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf 24,5 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde nun 1 h im Thermoblock (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 (4.5.6.1). 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 zu amplifizieren. Die PCR-Produkte wurden in einem 1% igen Agarosegel analysiert (4.5.4) und mit Hilfe des *G:Box Systems* und der *Gene tools* Software (Syngene) densitometrisch ausgewertet.

---

---

## 4.5.7 Klonierung von DNA-Fragmenten

### 4.5.7.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme

Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen New England Biolabs und Roche bezogen und mit den entsprechenden 10-fach (10x) Puffern gemäß den Angaben der Hersteller eingesetzt. Um Pufferunverträglichkeiten bei Spaltungen mit mehreren Enzymen zu umgehen, wurde die DNA gegebenenfalls nach jedem einzelnen Spaltungsansatz mit  $1/10$  Vol. 3 M NaOAc und 1 Vol. Isopropanol gefällt und erneut in  $H_2O_{bid.}$  aufgenommen. Für analytische Spaltungen wurden in der Regel 0,5 - 1  $\mu$ g DNA sowie je 3 - 10 U Restriktionsenzym eingesetzt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Präparative Restriktionsspaltungen enthielten 0,5 - 20  $\mu$ g DNA und je 50 U Enzym, bei einer Inkubation bei 37 °C für 2 -3 h. Bei der Klonierung adenoviraler Bacmid-DNA wurde je 1  $\mu$ g DNA mit 25 U Restriktionsenzym gespalten (*SfuI* bei 37 °C für 2 h; *PacI* bei 37 °C für 16 h). Zu spaltende PCR-Produkte wurden nach der PCR-Reaktion zunächst über NaOAc/Isopropanolfällung von nicht-inkorporierten Oligonucleotiden und dNTPs gereinigt und aufkonzentriert, bevor sie über Restriktionsenzymsspaltung für die Klonierung vorbereitet werden konnten. Nach der Spaltung wurden die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt (4.5.4) und gegebenenfalls aus dem Gel aufgereinigt (4.5.5).

### 4.5.7.2 Ligation und Transformation

Mit Restriktionsenzymen linearisierte Vektor-DNA wurde mit 5 U antarktischer Phosphatase (New England Biolabs) für 3 h bei 37 °C dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu verhindern. Vor der Ligation wurden die DNA-Fragmente aufgereinigt und deren Konzentration wie unter 4.5.3 bestimmt. Ein Standard-Ligationsansatz enthielt 20 - 100 ng Vektor-DNA sowie die drei- bis fünffache molare Menge an zu klonierender Fremd-DNA in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l mit 2  $\mu$ l 10x Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase (Roche). Für die kovalente Verknüpfung der Phosphodiesterbrücken wurde der Ansatz über Nacht bei 13 °C inkubiert und anschließend zur Transformation in *E. coli* (4.1.2) eingesetzt.

### 4.5.7.3 Identifizierung rekombinanter Klone

Ausgehend von den transformierten *E. coli*, die auf LB-Agarplatten mit geeigneten Antibiotika wuchsen, wurden möglichst kleine Einzelkolonien mit einer sterilen Pipettenspitze in LB-Flüssigmedium mit geeigneten Antibiotika überimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 UpM

inkubiert. Plasmid-DNA wurde durch alkalische Lyse (4.5.1) präpariert und in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> aufgenommen. Je 5 µl davon wurden durch Spaltung mit geeigneten Restriktionsenzymen (4.5.7.1) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese (4.5.4) analysiert. Die so identifizierten rekombinanten Klone wurden durch DNA-Sequenzierung (4.5.7.4) überprüft und als Glycerinkultur (4.1.1) aufbewahrt.

#### 4.5.7.4 DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurden 300 ng Plasmid-DNA bzw. 500 ng Bacmid-DNA und 6 pmol bzw. 10 pmol eines entsprechenden Oligonukleotidprimer mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf ein Endvolumen von 8 µl aufgefüllt. Die DNA-Sequenzierungen dieser Arbeit wurden von der Firma *GeneArt* oder *SeqLab* durchgeführt.

## 4.6 RNA-Techniken

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 bei Arbeiten mit RNA spezielle Vorkehrungen getroffen. Gegenstände aus Glas und Metall wurden in einem Heißluftsterilisator für 12 h bei 160 °C gebacken, ein Vorgang der RNasen irreversibel denaturiert. Alle Chemikalien wurden in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> 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 inaktivieren diese irreversibel. Durch das Erhitzen während des Autoklavierens zersetzt sich überschüssiges DEPC und stört nicht mehr in nachfolgenden Prozessen.

### 4.6.1 Präparation von RNA aus Säugerkzellen & cDNA-Synthese

Für den Nachweis der bereits fertig gespleißten mRNA von Ad5 E4orf3/4 wurde aus virusinfizierten Zellen mit Hilfe des *RNeasy*<sup>®</sup> Mini-Systems (Qiagen) (4.6.2) zunächst RNA isoliert. Optional wurde bei der Isolierung der mRNA eine nukleäre und eine zytoplasmatische Fraktion getrennt. Für die Isolierung von zytoplasmatischer und nukleärer RNA mussten die Säugerkzellen zunächst fraktioniert werden. Dazu eignen sich nur frisch geerntete Zellen, da

sich durch das Einfrieren Eiskristalle bilden, die die zelluläre Membran und die Kernmembran schädigen, und somit eine Durchmischung der Kompartimente stattfindet. Das Zellpellet aus der Zellernte (4.2.5) wurde in auf 4°C vorgekühlten 175 µl RLN-Puffer mit 1 mM DTT resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt) überführt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei 4°C für 2 min bei 700 g zentrifugiert (Kühlzentrifuge 5417 R; Eppendorf GmbH). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Diese Fraktion wurde als Zytoplasma-Fraktion bezeichnet. Das Pellet stellte die Zellkern-Fraktion dar. Die weitere Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen) nach Anweisung des Herstellers. Die gereinigte RNA wurde anschließend fotospektrometrisch (*NanoDrop ND1000*, 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. Anschließend wurde die RNA mit dem *Reverse Transcription System* (Promega) nach Angaben des Herstellers unter Verwendung eines Poly-(A)-Primers in cDNA umgeschrieben.

<b>RLN-Puffer</b>	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	140 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
	Nonidet P-40	0,5% (v/v)
	• in H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub> • Lagerung bei 4°C	

## 4.7 Protein-Techniken

### 4.7.1 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 eisgekühltem RIPA-Lysepuffer mit zugeetzten Proteaseinhibitoren (PMSF 1 mM, Aprotinin 10 U/ml, Leupeptin 1 µg/ml, Pepstatin 1 µg/ml und DTT 1% (v/v)) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Um die DNA zu scheren und 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 5417 R, Eppendorf GmbH), um größere Zellfragmente abzutrennen. Der Überstand, in dem

sich nun die wasserlöslichen Proteine befinden, wurde für weitere Experimente in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert.

<b>RIPA-Lysepuffer</b>	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	Nonidet P-40	1% (v/v)
	SDS	0,1% (w/v)
	Na-Desoxycholate	0,5% (v/v)
	Proteaseinhibitoren (siehe Text)	frisch zugeben

#### 4.7.2 Quantitative Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration wasserlöslicher Proteine einer Probe wurde mit Hilfe des *Protein-Assays* (BioRad) bestimmt. Bei diesem Testverfahren, das auf der Proteinquantifizierung nach Bradford beruht (Bradford, 1976), wird die auftretende Absorptionszunahme bei 595 nm fotospektrometrisch gemessen (*Smart Spec plus*; BioRad), nachdem die vorhandenen Proteine an das chromogene Substrat dieses Testsystems gebunden haben. Die Proteinkonzentration in der Probe lässt sich durch Vergleich der gemessenen OD<sub>595</sub> mit den Werten einer Eichkurve ermitteln. 1 µl der zu bestimmenden Proteinprobe bzw. 1 bis 20 µg des Eichproteins BSA (Rinderserumalbumin; New England Biolabs) wurden in Polystyrol-Küvetten (Sarstedt) mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> jeweils auf ein Gesamtvolumen von 800 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 200 µl Färbereagenz 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm fotospektrometrisch gegen den Nullwert (800 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> + 200 µl Färbereagenz) bestimmt.

#### 4.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 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 von 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 sog. Trenngel einwandern (Laemmli, 1970). Der Aufbau der verwendeten Gelapparaturen (Biometra) und

## METHODEN

das Gießen der Gele erfolgte entsprechend den Angaben der Hersteller. Die genaue Zusammensetzung der benötigten Gellösungen ist unten aufgeführt (Harlow und Lane, 1988). Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proteinproben mit dem gleichen Volumen eines zweifach konzentrierten SDS-Probenpuffers (Sambrook, 1989) versetzt und 3 min im Thermoblock (Eppendorf Thermomixer comfort) bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 20 mA pro Gel in TGS-Puffer bis die Bromphenolblau-Bande (markiert die Lauffront) das Ende des Gels erreichte. Im Anschluss an die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese konnten die aufgetrennten Proteine über *Western Blot*-Analyse (4.7.4) detektiert werden.

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

#### 4.7.4 *Western Blot -Analyseverfahren*

Voraussetzung für den immunologischen Nachweis der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine ist die Immobilisierung der Polypeptide auf Nitrozellulose- (Protran, Schleicher & Schuell) oder eine PVDF-Membran (*Polyvinyliden Fluoride*, PeqLab) nach dem *Western Blot*-Verfahren. Der Transfer erfolgte mit Hilfe einer *Trans-Blot<sup>®</sup> Electrophoretic Transfer Cell* (BioRad) nach Anleitung des Herstellers in *Towbin*-Transferpuffer bei einer Stromstärke von 400 mA für 30 – 90 min (100 mA, 60 min für E4orf3/4), je nach Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins. Zur Überprüfung des Transfers konnten die Proteine auf der Membran mit Ponceau S (Sigma) reversibel angefärbt werden. Zum Entfärben wurden die Membranen mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> gewaschen. Vor der Inkubation der Nitrozellulose- bzw. PVDF-Membran mit einem spezifischen Antikörper wurden die freien Bindungsstellen der Membran durch Inkubation in PBS mit 5% Magermilchpulver (Frema) 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 zu je 10 min in PBS-Tween gewaschen und für 1 h in einer 1:10000 Verdünnung eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers geschüttelt. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS-Tween für je 10 min folgte die Inkubation der Nitrozellulose- bzw. PVDF-Membran mit dem chemilumineszenten Substrat für die HRP-vermittelte Reaktion. Für den spezifischen Proteinnachweis wurde das *SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce) verwendet. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip der verstärkten Chemilumineszenz unter Beteiligung des Enzyms HRP (*horseradish peroxidase*) 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 Lichtemission, so dass eine maximale Intensität 5 – 20 min nach Einsetzen der Reaktion und eine anschließende Abnahme der Emission 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 Membranfilter gegeben. Nach 5 min Inkubationszeit wurde der Filter in Folie eingeschlagen. Die autoradiographische Detektion des Signals fand während Expositionszeiten zwischen 5 s und 2 h mit einem Röntgenfilm (*Medical X-ray film*; CEA RP *new*) statt. Der Film wur-

de anschließend mit Hilfe eines Entwicklungs- und Fixierautomaten (Kodak) entwickelt.

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

#### 4.7.5 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 durch Zentrifugation 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 Protein G binden spezifisch an den F<sub>c</sub>-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 5417 R; 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 (4.7.3) aufgetrennt und mittels *Western Blot* (4.7.4) 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 Protein G-Sepharose in 1 ml Lysepuffer (RIPA oder RIPA-*light*) eine Stunde bei 4 °C in einem Überkopfschüttler (GFL, Gesellschaft für Labortechnik) äquilibriert. Die Suspension wurde daraufhin 5 min bei 4 °C bei 6000 UpM abzentrifugiert (Kühlzentrifuge 5417 R; Eppendorf GmbH), das Sediment in 1 ml gekühltem Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren (PMSF 1 mM, 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 Inkubation von 2 h 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 5417 R; Eppendorf GmbH) abzentrifugiert, die Sepharose dreimal in 1 ml gekühltem Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren gewaschen, abzentrifugiert (6000 UpM, 5 min bei 4 °C; Kühlzentrifuge 5417 R; 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 (4.7.2) und über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler 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 bei 4 °C inkubiert und nach Zentrifugation (6000 UpM, 5 min, 4 °C) eingesetzt. Die nach der Immunpräzipitation erhaltene Suspension wurde abzentrifugiert (6000 UpM, 5 min, 4 °C), dreimal mit je 1 ml gekühltem Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren gewaschen, zentrifugiert (6000 UpM, 5 min, 4 °C; Kühlzentrifuge 5417 R; Eppendorf GmbH) und das Sediment in 20 µl SDS-Probenpuffer (Lämmli) aufgenommen, 5 min bei 95 °C aufgeköcht und anschließend 10 min bei 13 000 UpM abzentrifugiert (Kühlzentrifuge 5417 R; Eppendorf GmbH). Die Proben konnten nun SDS-PAGE (4.7.3) aufgetrennt und mit Hilfe von *Western Blot* (4.7.4) weiter analysiert werden.

<b>RIPA-Lysepuffer</b>	Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	Nonidet P-40	1% (v/v)
	SDS	0,1% (w/v)
	Na-Desoxycholate	0,5% (v/v)
	Proteaseinhibitoren (siehe Text)	frisch zugeben
<b>RIPA-light</b> (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)
	Proteasinhibitoren (siehe Text)	frisch zugeben

## 4.7.6 Immunfluoreszenz-Analysen

### 4.7.6.1 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 (4.4.5). Zur Fixierung der Zellen wurde das Medium abgesaugt, die bewachsenen Deckgläser mit PBS gewaschen und für 15 min in eiskaltem Methanol bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen bei RT getrocknet und konnten bei -20 °C gelagert oder sofort für die Immunfluoreszenzfärbung (4.7.6.2) weiter verwendet werden.

### 4.7.6.2 Immunologischer Nachweis

Für die Immunfluoreszenzanalysen wurden die mit Zellen bewachsenen Deckgläser direkt in der *6-well* Schale zur Absättigung unspezifischer Bindestellen 1 h in TBS-BG inkubiert. Nach Entfernen des Überstandes und drei Waschschritten mit PBS wurden pro Deckglas 20 µl Primärantikörper in geeigneter Verdünnung mit PBS zugegeben und 2 h bei RT. Um eine Verdunstung der Antikörperlösung zu verhindern sollte dabei die *6-well* Schale mit einem Deckel verschlossen sein. Nach dreimaligem Waschen mit PBS zu je 5 min, erfolgte auf die gleiche Weise die Inkubation mit dem sekundären, Fluorophor-markierten Antikörper, der als 1:200 Verdünnung in PBS eingesetzt wurde. Zur Anfärbung der DNA-Chromatinkomplexe wurden 0,5 µg/ml DAPI (Sigma) zugesetzt. Nicht-gebundener Sekundärantikörper wurde durch die folgenden drei Waschschrritte mit PBS zu je 5 min entfernt. Die Deckgläser wurden danach mit der Zell-bewachsenen Seite nach unten auf einen Objektträger gelegt und mittels *Glow Mounting Medium* (EnerGene) eingebettet. Die Versuchsansätze konnten abgedunkelt bei 4 °C mehrere Tage bis Wochen gelagert werden. Die weitere Analyse erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzlichtmikroskops (DM6000, Leica) mit digitalem Bildverarbeitungssystem (Leica Application Suite 1.6.1; Leica).

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

## 5 Ergebnisse

---

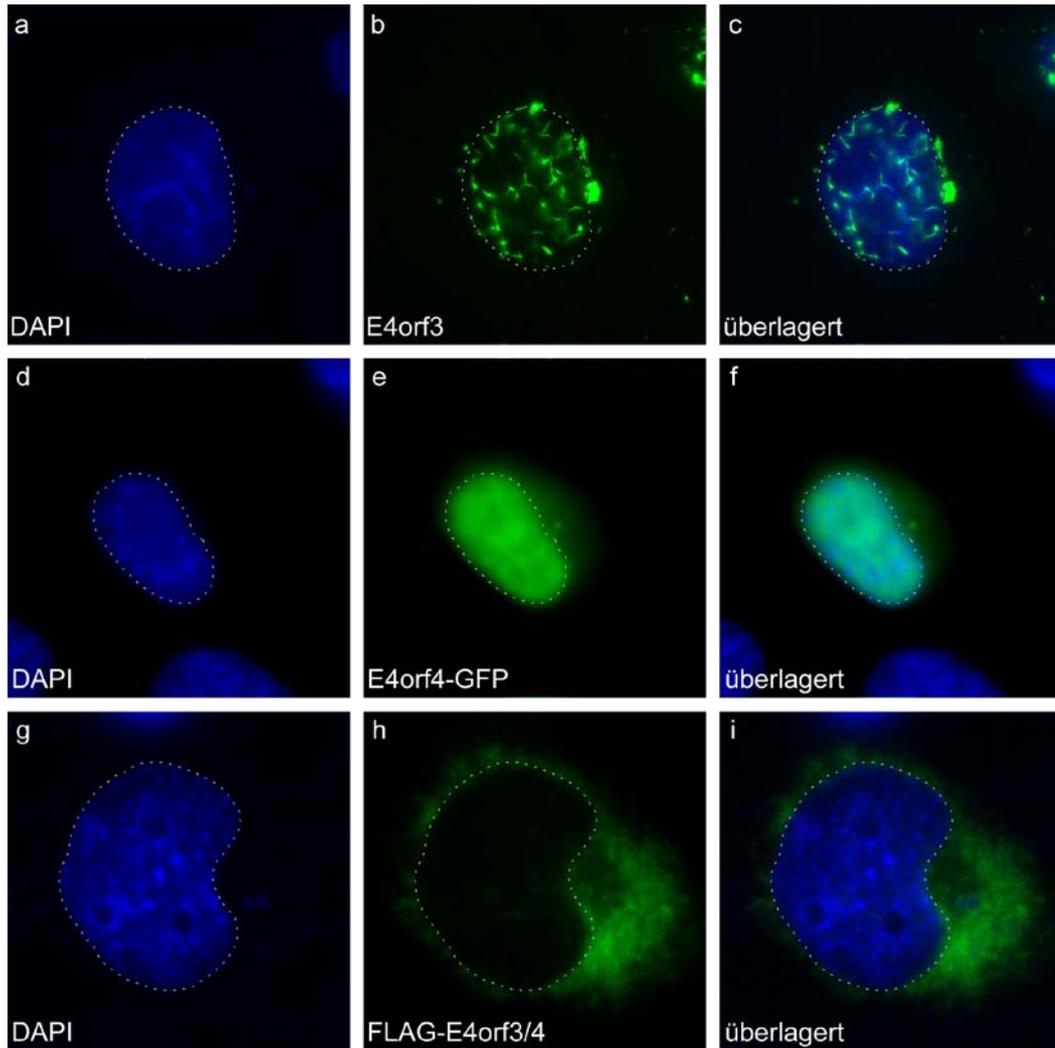
---

### 5.1 Expression von E4orf3/4 in transient transfizierten Säugerkzellen

Zur direkten Untersuchung des adenoviralen E4orf3/4-Proteins bzw. dessen Funktionen wurden Experimente mit transient transfizierten H1299-Zellen durchgeführt. Bei H1299-Zellen handelt es sich um eine humane Lungenkarzinom-Zelllinie, die als bewährtes Modellsystem für die Untersuchung adenoviraler Proteine in zahlreichen Experimenten verwendet wird.

#### 5.1.1 Subzelluläre Lokalisation von E4orf3/4

Da kaum experimentelle Daten zu E4orf3/4 vorhanden sind (Freyer *et al.*, 1984; Virtanen *et al.*, 1984), wurde dieses in transient transfizierten H1299-Zellen exprimiert um Hinweise auf dessen subzelluläre Lokalisation zu erhalten. Dazu wurde ein aminoterminal FLAG-fusioniertes E4orf3/4 in die Zellen eingeschleust (4.2.4.1), das Protein für Immunfluoreszenz-Analysen entsprechend angefärbt (4.7.6) und mit der Lokalisation von E4orf3 und E4orf4 verglichen.



**Abb. 9 Subzelluläre Lokalisation von E4orf3/4**

H1299-Zellen wurden mit je 1,5 µg Plasmid-DNA transfiziert (4.2.4.1) und 24 h p.t. mit MeOH fixiert (4.7.6.1). Die Immundetektion (4.7.6.2) erfolgte für E4orf3/4 mit dem FLAG-spezifischen primären Antikörper  $\alpha$ -FLAG (M2), für E4orf3 mit dem  $\alpha$ -E4orf3 (6A11) und entsprechenden Fluorochrom-markierten Sekundärantikörpern (3.4). Für E4orf4 wurde ein GFP-fusioniertes Konstrukt transfiziert. Der Zellkern (gestrichelte Linie) wurde mittels DAPI sichtbar gemacht.

Im Gegensatz zur subzellulären Lokalisation von E4orf3 (Abb. 9, b - c) bzw. E4orf4 (Abb. 9, e - f), ist E4orf3/4 in H1299-Zellen 24 h nach der Transfektion diffus und ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert (Abb. 9, h - i). Obwohl sich E4orf3/4 aus dem Aminoterminus von E4orf3 und dem Carboxyterminus von E4orf4 zusammensetzt (Abb. 6), zeigt es in seiner Lokalisation keine Ähnlichkeit mit E4orf3 oder E4orf4, die beide größtenteils nukleär lokalisiert sind. E4orf3 allein ist fähig filigrane, fadenartige Strukturen (*tracks*) im Zellkern auszubilden (Doucas und Evans, 1996) sowie perinukleäre Aggregate zu formen (Araujo *et al.*, 2005). E4orf4 ist im Zellkern überwiegend diffus verteilt und teilweise auch in den Nukleoli lokali-

siert (Abb. 9, e - f). Im Gegensatz dazu besitzt E4orf3/4 weder die Fähigkeit *tracks* auszubilden, noch zeigt es eine Lokalisation in perinukleären Aggregaten. Seine zytoplasmatische Lokalisation könnte unter anderem mit einem aktiven NES (Abb. 6) zusammenhängen.

### 5.1.2 Immunhistochemischer Nachweis des E4orf3/4-Proteins mittels *Western Blot* Analysen

Da bisher das Ad5 E4orf3/4 Genprodukt weder in Virus-infizierten noch in transient transfizierten Zellen nachgewiesen wurde, ist es von großem Interesse inwieweit die theoretischen Erkenntnisse über E4orf3/4 mit praktisch gewonnenen Daten übereinstimmen.

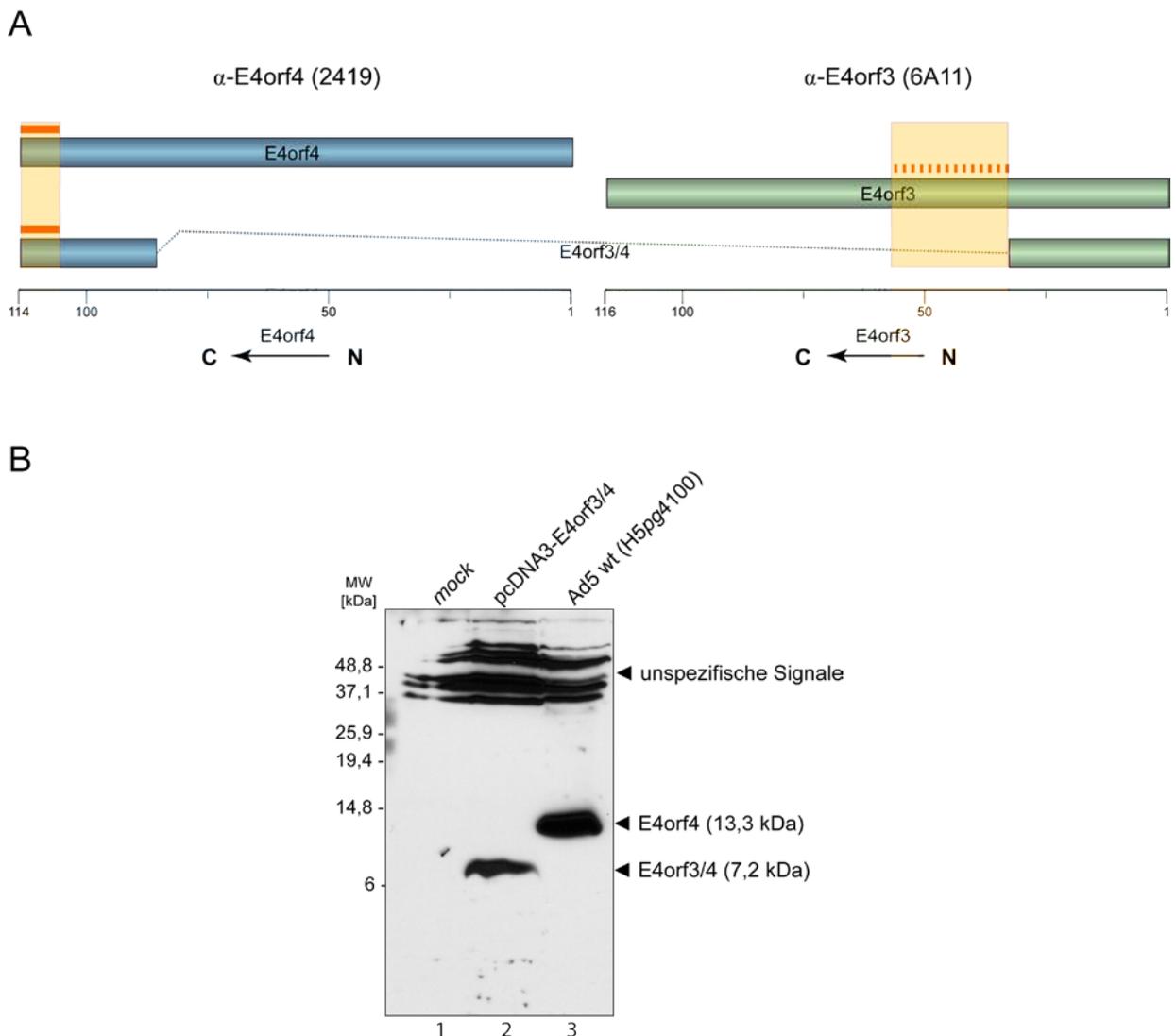


Abb. 10 Immunhistochemische Detektion E4orf3/4 und E4orf4 in transient transfizierten Zellen

(A) Binderegion der spezifischen Antikörper  $\alpha$ -E4orf4 (2419) und  $\alpha$ -E4orf3 (6A11). (B) H1299-Zellen wurden mit 5  $\mu$ g pcDNA3-E4orf3/4 transfiziert (4.2.4.1) bzw. mit Ad5 wt infiziert (moi 50 ffu/Zelle; 4.4.5). 48 h p.t. bzw. 48 h p.i. wurden die Zellen geerntet (4.2.5) und Gesamtzell-Proteinlysate hergestellt (4.7.1). Pro Spur wurden 150  $\mu$ g Proteinlysate mittels eines 15%-igen SDS-Gels (4.7.3) aufgetrennt und durch *Western Blot* auf eine PVDF-Membran transferiert (4.7.4). Die immunhistochemische Detektion erfolgte mit dem Antikörper  $\alpha$ -E4orf4 (2419) sowie einem entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper (3.4). (Alle Grafiken sind entsprechend der Orientierung der E4-Region auf dem Ad-Genom ausgerichtet, daher sind auch Aminosäuresequenzen in C-N-terminaler Orientierung gezeigt anstatt wie üblich von N nach C.)

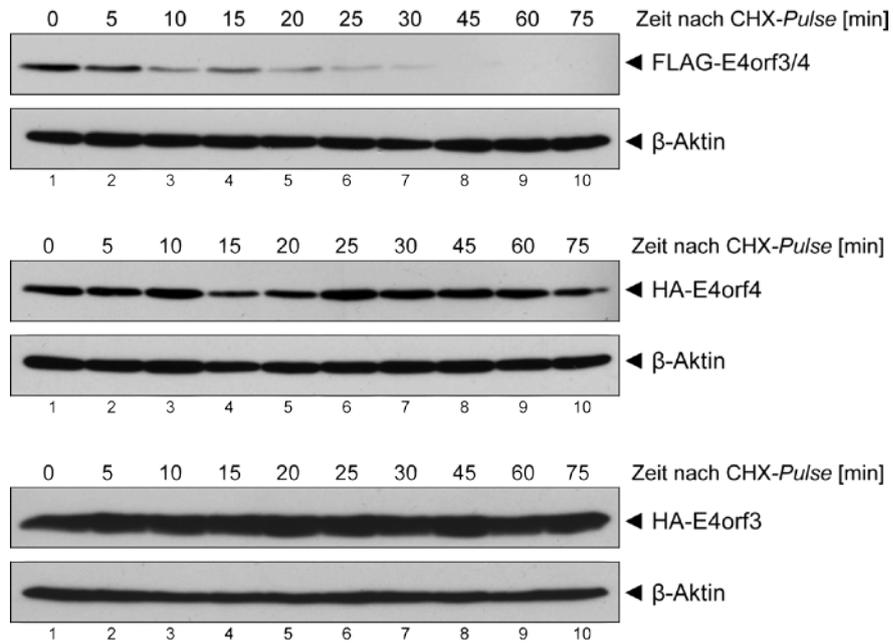
Im Rahmen dieser Untersuchungen ist es in transient transfizierten Zellen erstmals gelungen, E4orf3/4 mit einem E4orf4 spezifischen Antikörper nachzuweisen (Abb. 10, Spur 2), während in wt-infizierten Zellen nur ein Signal für das Volllängeprotein E4orf4 detektiert werden konnte (Abb. 10, Spur 3). Der E4orf4 spezifische Antikörper  $\alpha$ -E4orf4 (2419) erkennt ein Epitop am äussersten C-Terminus von E4orf4 (Abb. 10) welches auch in E4orf3/4 vorhanden ist. Zum Nachweis von E4orf3/4 mittels Fluoreszenzlichtmikroskopie ist dieser Antikörper jedoch nicht geeignet, da auch unspezifische zelluläre Proteine damit detektiert werden (Abb. 10). Konsistent mit den theoretischen Daten konnte im denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel für das E4orf3/4-Genprodukt ein Molekulargewicht von 7,2 kDa gezeigt werden (Abb. 10, Spur 2).

Obwohl E4orf3/4 in virusinfizierten Zellen bisher nicht detektiert werden konnte, ist es möglich, ausgehend von der cDNA-Sequenz unter Kontrolle des starken CMV-Promotors, E4orf3/4 auf Proteinebene nachzuweisen (Abb. 10, Spur 2). Dagegen wird die Transkription der E4-Genprodukte während der Virusinfektion über die Aktivität des E4-Promotors reguliert was zu einer vergleichsweise geringeren Expression führt.

### 5.1.3 Analysen zur Halbwertszeit von E4orf3/4

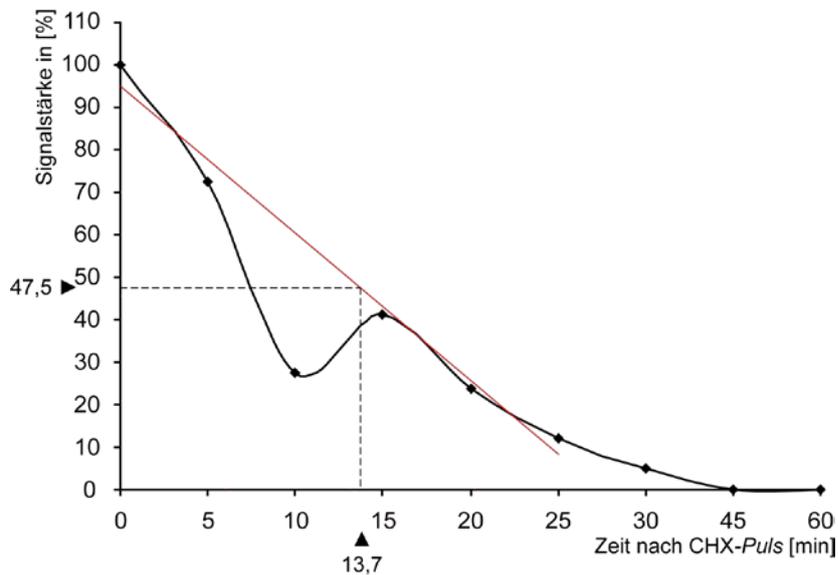
Um die Stabilität von E4orf3/4 in virusinfizierten Zellen zu untersuchen, wurde die Halbwertszeit von E4orf3/4 ermittelt. Dazu wurden H1299-Zellen mit einem FLAG-E4orf3/4 Expressionskonstrukt transfiziert und 24 h p.t. mit Cycloheximid behandelt. Cycloheximid ist ein Antibiotikum, das von Streptomyceten (*Streptomyces griseus*) produziert wird und als Translationshemmer bei Eukaryoten durch Blockierung der Proteinbiosynthese wirkt. Es handelt sich um einen klassischen Translationshemmer der zur Identifikation kurzlebiger Proteine verwendet wird und dabei eine nicht-radioaktive Alternative zu *pulse-chase* Experimenten darstellt.

A



B

Cycloheximid Halbwertszeitbestimmung von E4orf3/4



ermittelte Halbwertszeit für E4orf3/4: 13 min 42 s

**Abb. 11 Proteinstabilität von E4orf3/4, E4orf3 und E4orf4 nach Cycloheximid-Zugabe**

(A)  $2,0 \times 10^5$  H1299-Zellen wurden 24 h p.t. mit Cycloheximid (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) behandelt, zu den angegebenen Zeitpunkten nach bzw. vor (0) der Cycloheximid-Zugabe geerntet (4.2.5) und Proteinlysate hergestellt (4.7.1). Es wurden jeweils 40  $\mu\text{g}$  Gesamtzelleextrakt (4.7.1) über SDS-PAGE aufgetrennt (4.7.3), auf PVDF-Membranen mittels *Western Blot* transferiert (4.7.4), mit den Antikörpern gegen das FLAG-Epitop ( $\alpha$ -FLAG M2), das HA-Epitop ( $\alpha$ -HA 3F10), gegen  $\beta$ -Aktin (AC-15) sowie entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörpern inkubiert (3.4). (B) Aus (A) ermittelte graphische Darstellung der re-

lativen Signalstärke des FLAG-E4orf3/4 im zeitlichen Verlauf. Die rote Gerade markiert dabei die Regressionsgerade der Zeitpunkte 0 - 25 min, wobei der 10 min Wert nicht einberechnet wurde. Zur quantitativen Bestimmung der Signalstärke wurde die Software *Gene Tools* (Syngene) verwendet.

Durch diese Analysen wird deutlich, dass die Gleichgewichtsmengen des FLAG-E4orf3/4 nach Zugabe des Translationshemmers Cycloheximid (100 µg/ml) sehr stark abnehmen und 30 min nach der Antibiotika-Zugabe nur noch Spuren von E4orf3/4 detektierbar sind (Abb. 11, A). Bereits 45 min nach der Behandlung mit Cycloheximid ist E4orf3/4 nicht mehr nachzuweisen. Dies unterstützt die Annahme, dass E4orf3/4 entweder sehr instabil ist, oder dass es durch zelluläre Proteine modifiziert wird, so dass das FLAG-Epitop für den Antikörper nicht mehr zugänglich ist. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die Gleichgewichtsmengen von E4orf3 bzw. E4orf4 während des untersuchten Zeitraums durch Cycloheximid nicht beeinflusst werden (Abb. 11, A). Im Gegensatz zu E4orf3/4 zeigen die Untersuchungen, dass E4orf3 und E4orf4 eine wesentlich höhere Stabilität besitzen als E4orf3/4 (Abb. 11, A). Die densitometrische Auswertung des Bandenmusters von FLAG-E4orf3/4 (Abb. 11, A) zeigt eine annähernd lineare Reduktion der E4orf3/4-Gleichgewichtsmengen zwischen den Zeitpunkten 0 und 25 min nach Zugabe von Cycloheximid (Abb. 11, B). Ermittelt man aus der Grafik die Halbwertszeit für E4orf3/4, so ergibt sich ein errechneter Wert zwischen 13 und 14 min.

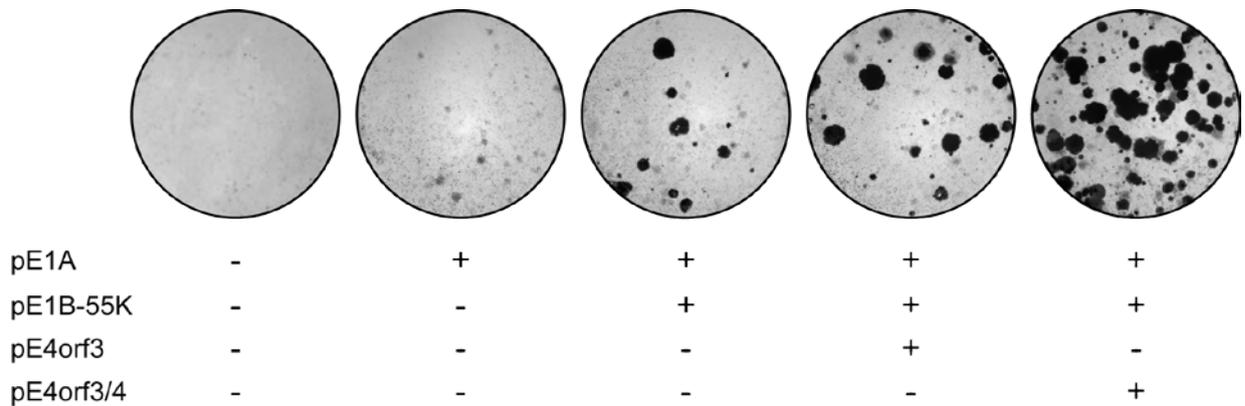
## 5.2 Untersuchungen zum transformierenden Potenzial von E4orf3/4

In klassischen Experimenten zur Onkogenität adenoviraler Genprodukte wachsen transformierte Zellen zu mehrschichtigen Kolonien (*Foci*) heran, welche nach 2 - 3 Wochen makroskopisch beobachtet werden können. Die transformierten Zellen sind neben der Fähigkeit zu unbegrenztem Wachstum auch durch den Verlust der Kontaktinhibition und verminderter Serumabhängigkeit gekennzeichnet (Nevels, 1999), während primäre Zellen nach einer gewissen Anzahl von Teilungen das Wachstum einstellen und einen Zustand replikativer Seneszenz erreichen (Hayflick, 1968). Zusammen mit E1A sind die E1B-Proteine in der Lage nicht-permissive Wirtszellen vollständig zu transformieren (McLorie *et al.*, 1991; White, 1998). Diese Eigenschaft wurde anfangs allein den Genprodukten der frühen Region 1A und 1B (E1A und E1B) zugeschrieben (Bernards und Van der Eb, 1984; Graham, 1984; Shenk und Flint, 1991), konnten allerdings später um die Genprodukte E4orf3 (Täuber, 1998; Nevels *et al.*, 1999b) und

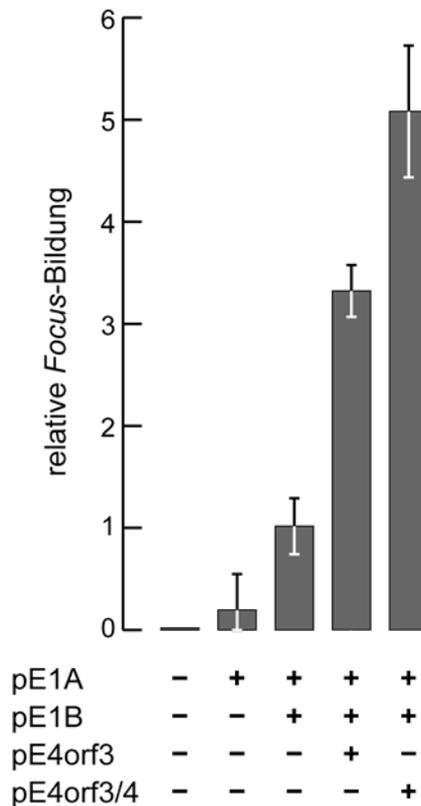
E4orf6 (Nevels *et al.*, 1999a) ergänzt werden. In Kombination mit den Proteinen der E1-Region (E1A und E1B-55K) zeigte E4orf3 ein transformationsförderndes Potenzial (Nevels *et al.*, 1999b) während Wildtyp E4orf4 eine pro-apoptotische Aktivität besitzt (Kleinberger, 2000) und daher für Untersuchungen in Transformations-*Assays* nicht geeignet ist.

Um die Transformationseigenschaften von E4orf3/4 zusammen mit E1A und E1B-55K näher zu analysieren wurde die Transformation von primären BRK-Zellen mit Hilfe von klassischen Transformations-*Assays* untersucht. Dabei wurden die Zellen mit einem oder mehreren rekombinanten Plasmiden die für Proteine aus der E1- bzw. der E4-Region kodierten (3.3.3), kointransfiziert. Nach einer Inkubation von 3 - 4 Wochen bildeten transformierte Zellen mehrschichtige Kolonien (*Foci*) aus, während nicht-transformierte Zellen absterben. Die Anzahl der entstandenen *Foci* ist ein Hinweis auf das transformierende Potenzial der viralen Genprodukte im *in vitro* System.

A



B

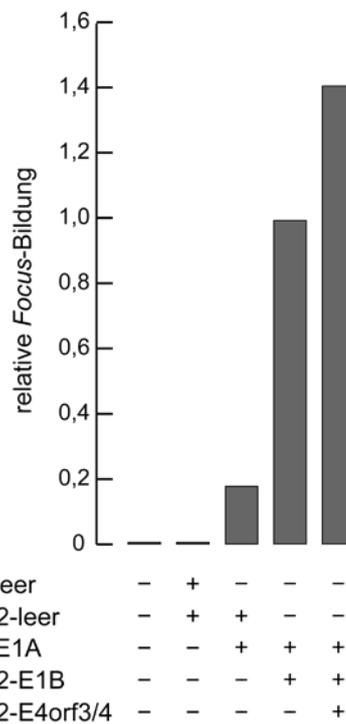


**Abb. 12 Transformierendes Potenzial von E4orf3 und E4orf3/4 in Kooperation mit E1A und E1B-55K**

(A) Primäre BRK-Zellen (pBRK,  $3,0 \times 10^6$  Zellen/100 mm-Schale) wurden mit den rekombinaten Plasmiden pE1A (2,5  $\mu$ g), pE1B (2,5  $\mu$ g), pE4orf3 (1,0  $\mu$ g) und pE4orf3/4 (1,0  $\mu$ g) transfiziert (4.2.4.1), weiterkultiviert (4.2.6) und nach 3 - 4 Wochen mit Kristallviolett gefärbt. (B) Die Transformationsaktivität wurde als relative *Focus*-Bildung zur Aktivität von pE1A + pE1B dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

Konsistent mit bereits durchgeführten Analysen zeigen die Ergebnisse, dass E1A allein fähig ist pBRK-Zellen zu immortalisieren. Die einschichtigen Zellkolonien konnten nach Kristallviolett-Färbung als helle *Foci* detektiert werden (Abb. 12, A). Bei Kotransfektion von E1A und E1B-55K konnte wie erwartet eine vollständige Transformation primärer BRK-Zellen beobachtet werden (Abb. 12, A) (Nevels *et al.*, 1997). Nach heutigem Wissensstand ist E4orf3 in der Lage, das transformierende Potenzial von E1A und E1B-55K zu steigern (Nevels, 1999). Vermutlich steht diese Beobachtung mit der Stabilisierung von E4orf3 durch E1B-55K und einer Kooperation mit dem E1B-Genprodukt in Verbindung. Interessanterweise führt die Kotransfektion von E1A, E1B-55K und E4orf3/4 zu einer fünffach stärkeren *Focus*-Bildung verglichen mit dem Kontrollansatz von E1A plus E1B-55K (Abb. 12). Während die Zahl der *Foci* bei einer Kotransfektion von E1A, E1B-55K und E4orf3 um das dreifache gesteigert wurde (Abb. 12, B). Dieses Ergebnis zeigt erstmals, dass E4orf3/4 ein starkes *Focus*-stimulierendes Potenzial besitzt. Trotz der Sequenzhomologien von E4orf3/4 mit E4orf3 sowie E4orf4 deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass das virale Fusionsprotein die E4orf4 vermittelten proapoptischen Funktionen nicht besitzt, aber die transformationsfördernden Eigenschaften von E4orf3 in E4orf3/4 zusätzlich gesteigert sind. Um die transformationsfördernde Eigenschaft von E4orf3/4 in einem anderen System zu untersuchen, wurde ein zusätzlicher Transformations-*Assay* mit Hilfe rekombinanter lentiviraler Partikel durchgeführt (3.3.3). Durch den lentiviralen Vektoranteil integrieren die adenoviralen cDNA-Sequenzen effizienter ins Genom der Wirtszellen als dies bei der Transfektion der Fall ist (Dull *et al.*, 1998).

Im Vorfeld dieser Untersuchungen wurden die cDNAs der adenoviralen Proteine E1A, E1B-55K und E4orf3/4 in lentivirale iCer2- und iV2-Vektoren kloniert. Zur Transformationsanalyse wurden primäre BRK-Zellen mit jeweils gleichen Mengen lentiviraler Partikel (E1A-iV2, E1B- iCer2, E4orf3/4-iCer2) transduziert. In den Kontrollansätzen wurden die entsprechenden lentiviralen Partikel ohne adenovirale Gene (iV2, iCer2) untersucht, um eine mögliche unspezifische *Focus*-Bildung durch Integrationsmutagenese auszuschließen (Abb. 13).



**Abb. 13 Transformierendes Potenzial von E4orf3/4 in Kooperation mit E1A und E1B-55K**

Primäre BRK-Zellen (pBRK,  $3 \times 10^5$  Zellen/*well*) wurden mit den rekombinaten lentiviralen Partikeln iV2-E1A, iCer2-E1B und iCer2-E4orf3/4 transduziert ( $1,0 \times 10^5$  Partikel pro kodierendes Protein) (4.2.4.3), weiterkultiviert (4.2.6) und nach 3 Wochen mit Kristallviolett gefärbt. Die Transformationsaktivität wurde dargestellt als relative *Focus*-Bildung zur Aktivität von E1A + E1B. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen.

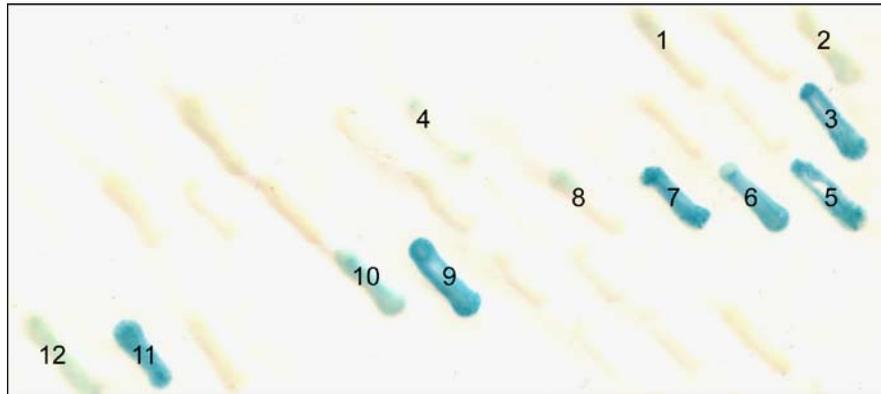
Konsistent zu den klassischen Transformationsanalysen (Abb. 12), besitzt E4orf3/4 auch im lentiviralen Versuchsansatz ein *Focus*-stimulierendes Potenzial in Kooperation mit E1A und E1B-55K. Die Kotransduktion von E1A und E1B-55K mit E4orf3/4 erhöht die relative *Focus*-Bildung um 40% im Vergleich zu E1A und E1B-55K alleine und gibt weitere Hinweise auf ein transformationsförderndes Potenzial dieses adenoviralen E4-Fusionsproteins. Das verminderte onkogene Potenzial von E4orf3/4 im lentiviralen Ansatz (Abb. 13) verglichen zum klassischen Ansatz (Abb. 12) ist vermutlich systembedingt, obwohl die Fremd-DNA im lentiviralen System besser ins Wirtszellgenom integrieren kann.

### 5.3 Identifizierung von PCNA als Interaktor von E4orf3/4 im Hefe-Zwei-Hybridsystem

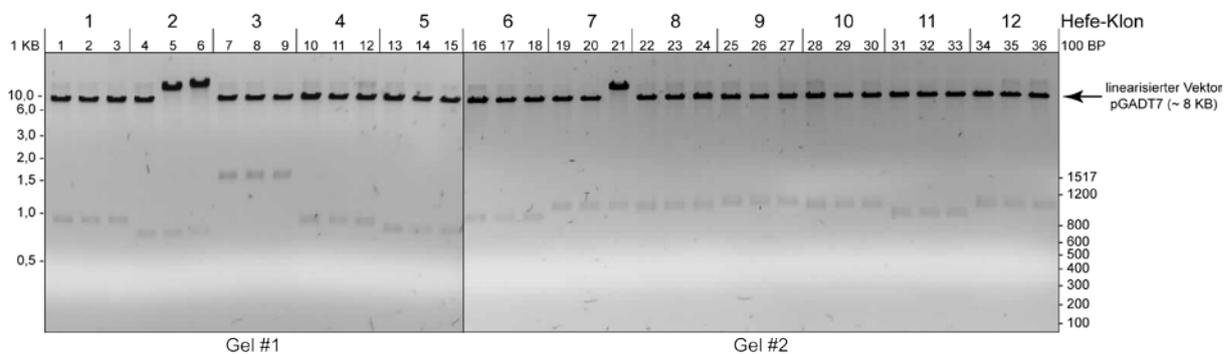
Für die Detektion möglicher zellulärer Interaktionspartner von E4orf3/4 auf Proteinebene

wurde im Hefe-Zwei-Hybrid-System ein *Screening* durchgeführt (4.3). Hierzu wurde in den Hefe-Expressionsvektor pGBKT7 die cDNA-Sequenz von E4orf3/4 in den Leserahmen einer GAL4 DNA-Bindedomäne kloniert. Zur Identifikation zellulärer Interaktionspartner des viralen Genproduktes wurde die Suche mit einer cDNA-Bibliothek aus B-Zellen durchgeführt (Abb. 14).

A



B



**Abb. 14 Identifikation von Interaktionspartnern für E4orf3/4 im Hefe-Zwei-Hybrid-System**

(A) Weiße und blaue (positive) Hefekolonien nach  $\beta$ -Galaktosidase-Filter-Lift-Assay (4.3.3). (B) Pro positivem Hefeklon wurde aus jeweils drei *E. coli* Übernachtskulturen die Plasmid-DNA extrahiert (4.5.1) und durch eine *Xho*I-Kontrollspaltung die insertierten cDNAs herausgeschnitten. Die jeweiligen Ansätze wurden in zwei 1,5%igen-Agarosegelen aufgetrennt (4.5.4). Die DNA des linearisierten Vektors pACT migriert in etwa bei 8,0 kb, die insertierten cDNAs entsprechend darunter.

Nach erfolgreicher Selektion auf HWL-Platten (Hefeselektionsplatten ohne Histidin, Tryptophan und Leucin) wurde ein sogenannter  $\beta$ -Galaktosidase-Filter-Lift Assay (4.3.2) durchgeführt. Zweifachtransformierte Hefekolonien, in denen eine Interaktion zwischen *bait*- und *prey*-Protein stattfindet sind blau gefärbt (Abb. 14, A). Zur Treffersuche wurde daraus die Plasmid-DNA extrahiert, in *E. coli* transformiert und amplifiziert. Im Anschluss daran wurde

mit je drei DNA-Proben aus den *E. coli*-Klonen eine *XhoI* Kontrollspaltung durchgeführt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurde die DNA aus den Klonen sequenziert (Abb. 14, B). Nach Sequenzvergleich mit der NCBI-Datenbank wurden folgende Proteine als mögliche Interaktoren für E4orf3/4 identifiziert (Tab. 2).

**Tab. 2 Zusammenfassung der identifizierten Interaktionspartner für E4orf3/4**

Die gelisteten Proteine wurden im *Screening* mit E4orf3/4 nachgewiesen. Die cDNA-Fragmente wurden sequenziert und anhand der Datenbankeinträge identifiziert.

Identifiziertes Protein:	Accession:	Funktion:
<b>MRPL12</b> ( <i>mitochondrial ribosomal protein L12</i> ) ( <i>Homo sapiens</i> )	BC007497.2	- Beteiligung an Proteinsynthese innerhalb der Mitochondrien; - Beteiligung an Zellwachstumskontrolle;
<b>PCNA</b> ( <i>proliferating cell nuclear antigen</i> ) Transkript Variante 1 ( <i>Homo sapiens</i> )	NM_002592.2	- kernlokalisiert; - Kofaktor der DNA-Polymerase $\delta$ ; - Steigerung der <i>leading-strand</i> Synthese während der DNA-Replikation; - Beteiligung an RAD6-abhängiger DNA Reparatur;

MRPL12 ist ein mitochondriales Protein, welches die ATP-Produktion in den Mitochondrien beeinflusst (Marty und Fort, 1996). PCNA ist ein nukleäres Protein das als Kofaktor der DNA-Polymerase  $\delta$  dient und an der *leading-strand* Synthese sowie der Rad6-abhängigen DNA-Reparatur beteiligt ist (Moldovan *et al.*, 2007). Nach heutigem Wissensstand gewährleisten humane Adenoviren eine maximale Virusproduktion unter anderem durch die Modulation von DNA-Reparatur-Mechanismen (Stracker *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2005). Daher wurde aus den zwei identifizierten Interaktoren von E4orf3/4 das ebenfalls an der DNA-Reparatur beteiligte PCNA genauer untersucht.

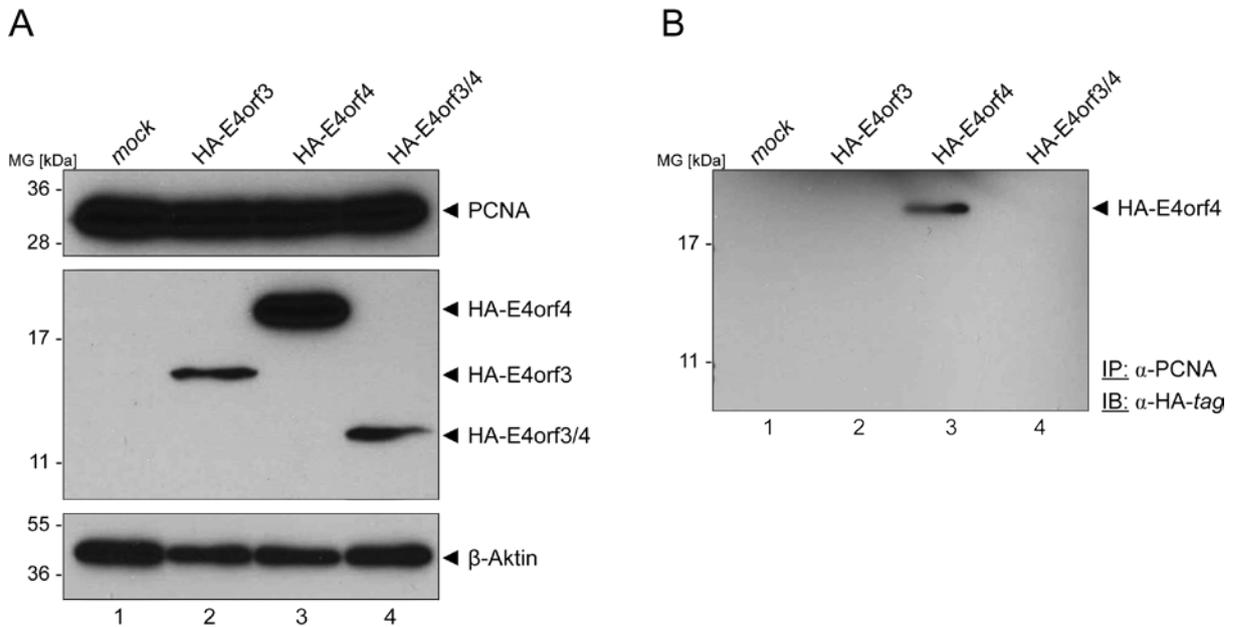
## 5.4 Analysen zur Interaktion von E4orf3/4 und E4orf4 mit PCNA

### 5.4.1 PCNA bindet an E4orf4 in transient transfizierten und Ad5-infizierten H1299-Zellen

PCNA formt eine Ringklemme für die DNA-Polymerase  $\delta$  und ist an der DNA-Replikation sowie der Rad6-abhängigen DNA-Reparatur beteiligt (Moldovan *et al.*, 2007). Außerdem wird es in der Medizin unter anderem als Tumormarker verwendet (Hall *et al.*, 1990; Lorz *et al.*,

1994).

Um eine Wechselwirkung des adenoviralen Fusionsproteins E4orf3/4 mit dem zellulären PCNA in humanen Zellen nachzuweisen, wurden zunächst Koimmunpräzipitationsanalysen (4.7.5) nach transients Transfektion mit HA-Expressionsplasmiden durchgeführt. Das HA-Epitop ermöglicht dabei die Detektion der zu untersuchenden adenoviralen Proteine (E4orf3, E4orf4, E4orf3/4) mit einem HA-spezifischen Antikörper (Abb. 15).



**Abb. 15 Interaktion von PCNA mit E4orf4 in transfizierten H1299-Zellen**

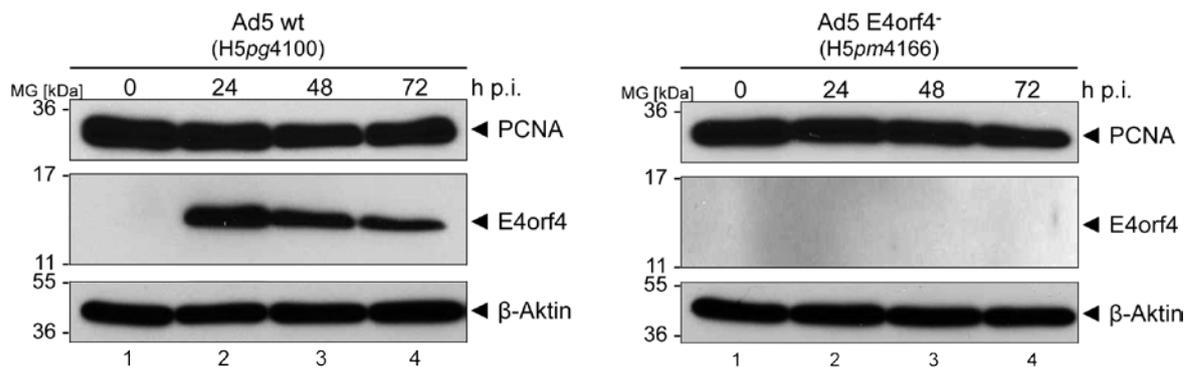
H1299-Zellen wurden mit HA-E4orf3, HA-E4orf4 und HA-E4orf3/4 Expressionsplasmiden transfiziert (4.2.4.1), 20 h p.t. geerntet (4.2.5) und lysiert (4.7.1). (A) Zur Überprüfung der Expression wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt (40  $\mu$ g) über 15%ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt (4.7.3), mittels *Western Blot* auf PVDF-Membranen übertragen (4.7.4) und mit Antikörpern gegen PCNA ( $\alpha$ -PCNA F-2), HA-Epitop ( $\alpha$ -HA 3F10) und  $\beta$ -Aktin (AC-15) und entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörpern inkubiert (3.4). (B) Zur Koimmunpräzipitation der verschiedenen HA-fusionierten E4-Proteine mit PCNA wurden 3 mg Zellysate mit dem PCNA-Antikörper immunpräzipitiert (4.7.5) und anschließend über 15%ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt (4.7.3). Anschließend wurden die Proteine mittels *Western Blot* auf PVDF-Membranen übertragen und mit Antikörpern gegen das HA-Epitop inkubiert (4.7.4).

Die HA-fusionierten E4-Proteine zeigten bei diesem Experiment verschieden starke Signale (Abb. 15, A). Dies könnte möglicherweise durch eine schwankende Transfektionseffizienz oder Proteininstabilität erklärt werden. Des Weiteren ist deutlich zu erkennen, dass auch unter stringenten Versuchsbedingungen (RIPA-Lysepuffer) eine Bindung von E4orf4 an PCNA nachzuweisen ist. Eine Bindung von E4orf3 bzw. E4orf3/4 konnte nicht detektiert werden. Im Unterschied zum Hefe-System ist hier keine Interaktion von E4orf3/4 mit PCNA zu detek-

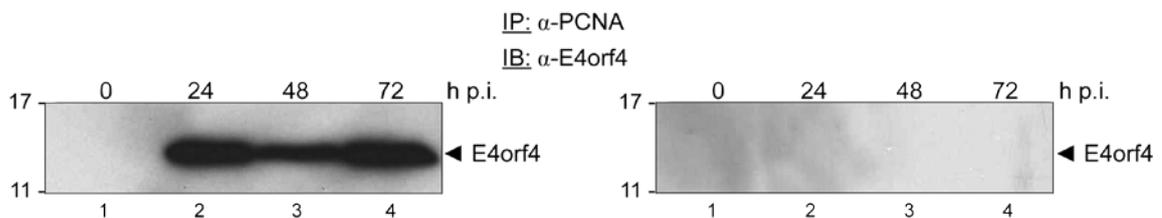
tieren. Möglicherweise konnte eine Wechselwirkung zwischen E4orf3/4 und PCNA aufgrund der bereits beschriebenen sehr kurzen Halbwertszeit von E4orf3/4 (5.3.1; Abb. 11, B) nicht nachgewiesen werden (Abb. 15, B; Spur 4). Die Ergebnisse aus dem Hefe-Zwei-Hybridsystem legen nahe, dass die Bindung von E4orf3/4 an PCNA auf die 28 carboxyterminalen Aminosäurereste von E4orf4, die es mit E4orf3/4 gemeinsam hat, zurückzuführen ist. Um sicherzustellen, dass eine Wechselwirkung von E4orf4 und PCNA nicht durch das HA-Epitop oder der *spacer*-Sequenz zustande kommt, wurden die Koimmunpräzipitationsanalysen auch in virusinfizierten Zellen durchgeführt.

Hierzu wurden H1299-Zellen mit Ad5 wt (H5pg4100) und Ad5 E4orf4<sup>-</sup> (H5pm4166) infiziert (4.4.5). Die Ad5 E4orf4<sup>-</sup>-Mutante diente in diesem Experiment als Negativkontrolle. Die infizierten Zellen wurden 24, 48 und 72 h nach Infektion geerntet, lysiert und mittels *Western Blot*-Analysen (4.7) untersucht.

A



B

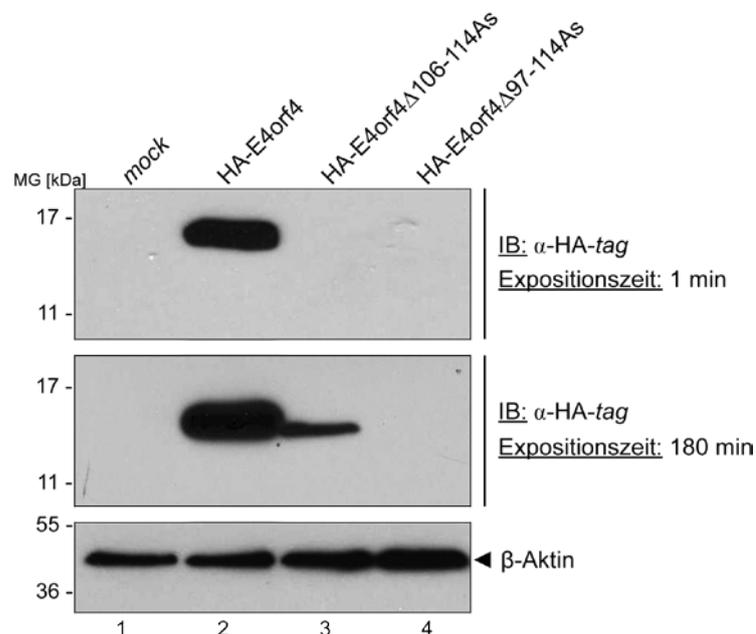


**Abb. 16 Interaktion von PCNA mit E4orf4 in infizierten H1299-Zellen**

H1299-Zellen wurden mit Ad5 wt (H5pm4100) und Ad5 E4orf4<sup>-</sup> (H5pm4166) mit einer *moi* von 20 ffu/Zelle infiziert (4.4.5), zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion (h p.i.) geerntet (4.2.5) und lysiert (4.7.1). (A) Zur Überprüfung der Expression wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzell-extrakt (40 µg) mittels 15%iger SDS-Polyacrylamidgels aufgetrennt (4.7.3), durch *Western Blot* auf PVDF-Membranen übertragen und mit Antikörpern gegen PCNA, E4orf4, β-Aktin und entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörpern (3.4) inkubiert (4.7.4). (B) Zur Koimmunpräzipitation von E4orf4 mit PCNA wurden 6 mg Zelllysat mit dem PCNA-Antikörper (α-PCNA F-2) immunpräzipitiert (4.7.5) und über 15%ige SDS-Polyacrylamidgels aufgetrennt (4.7.3). Anschließend wurden die Proteine mittels *Western Blot* auf PVDF-Membranen übertragen und mit Antikörpern (α-E4orf4 2419) gegen E4orf4 detektiert.

Die Daten zeigen, dass die E4orf4-Gleichgewichtsmengen in Ad5 wt infizierten Zellen im Vergleich zur transienten Transfektion (Abb. 15, A; Spur 3) erhöht sind und im weiteren zeitlichen Verlauf der Virusinfektion abnehmen (Abb. 16, A; Spuren 2 - 4). Dies hängt mit der negativen auto-regulatorischen Funktion von E4orf4 (Bondesson *et al.*, 1996) und dem Absterben der infizierten Zellen zusammen. Wie erwartet, konnte in Ad5 E4orf4- (H5pm4166) infizierten Zellen kein E4orf4 detektiert werden. In beiden Ansätzen scheinen sich die zellulären PCNA-Gleichgewichtsmengen im zeitlichen Verlauf der Infektion nicht zu verändern (Abb. 16, A). Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnte erstmals eine Bindung von E4orf4 an PCNA in Ad5-infizierten humanen Zellen bestätigt werden (Abb. 16, B). Dadurch kann eine unspezifische Wechselwirkung von E4orf4 mit dem HA-Epitop oder einer *spacer*-Sequenz ausgeschlossen werden.

Da E4orf3/4 und E4orf4 am C-Terminus identische 28 Aminosäurereste besitzen und diese möglicherweise die Binderegion an PCNA darstellen, sollte in weiterführenden Analysen mit C-terminal verkürzten E4orf3/4- und E4orf4-Expressionskonstrukten das Bindemotiv weiter eingegrenzt werden. Wegen einer stark erhöhten Instabilität der jeweils um 8 As verkürzten E4orf4-Konstrukte konnten jedoch in Koimmunpräzipitationsanalysen keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden (Abb. 17).



**Abb. 17 Gleichgewichtsmengen der verkürzten E4orf4-Proteine in transient transfizierten H1299-Zellen**

H1299-Zellen wurden mit den HA-fusionierten Expressionsplasmiden transfiziert (4.2.4.1), 20 h p.t. geerntet (4.2.5) und Gesamtzellextrakt hergestellt (4.7.1). Mittels eines 15%igen SDS-Polyacrylamidgels wurden die Proteine aufgetrennt (4.7.3) und durch *Western Blot* auf PVDF-Membranen übertragen

(4.7.4). Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen das HA-Epitop ( $\alpha$ -HA 3F10) und  $\beta$ -Aktin (AC-15) sowie entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörpern (3.4).

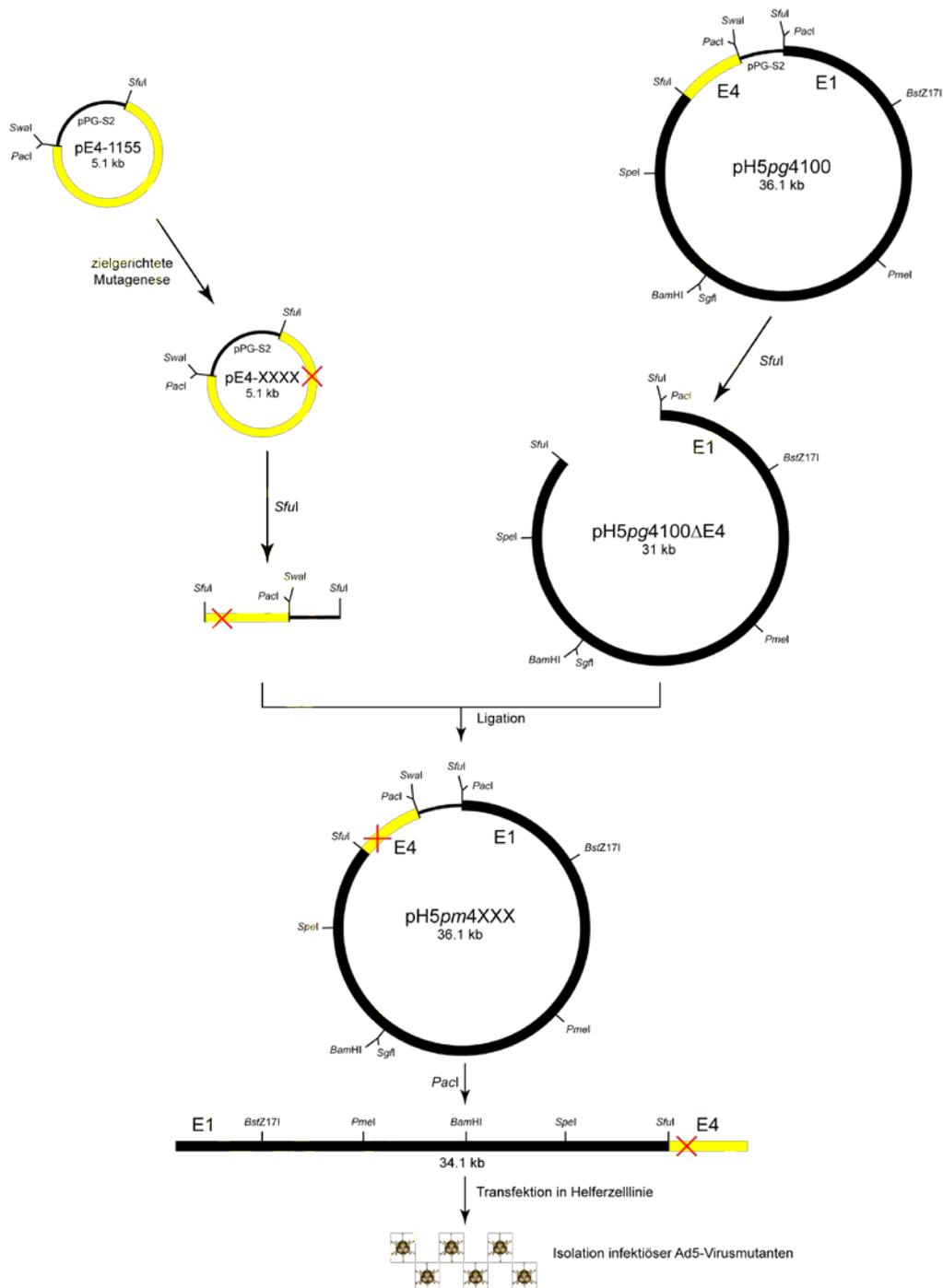
Trotz Variation der eingesetzten DNA-Mengen war es nicht möglich die Expression der C-terminal verkürzten E4orf4-Proteine anzugleichen, so dass ein mögliches Bindemotiv von E4orf4 an PCNA nicht weiter eingegrenzt werden konnte. Nach heutigem Wissensstand führen Mutationen innerhalb des Carboxyterminus von E4orf4 zu verminderten Expressionsmengen des Proteins (Shtrichman *et al.*, 1999; Marcellus *et al.*, 2000). Möglicherweise trifft dies auch für C-terminal verkürzte Varianten des E4orf4-Proteins zu.

## 5.5 Herstellung von Ad5 E4 Null-Virusmutanten

Mit Hilfe der Transfektionsexperimente (5.1), Transformations-*Assays* (5.2) und Hefe-Zwei-Hybrid Analysen (5.3) konnten bereits einige Erkenntnisse zu den putativen Funktionen von E4orf3/4 gewonnen werden. Im anschließenden Schritt sollten nun auch Funktionen von E4orf3/4 im lytischen Infektionszyklus von Ad5 genauer studiert werden.

Bisher wurden Funktionen von E4-Proteinen im viralen Kontext v. a. mit Hilfe von Transfektions-/Infektions-Analysen unter Verwendung von chimären Ad2/Ad5-Deletionsmutanten untersucht. Dabei wird ein Plasmid, das einen mutagenisierten viralen Leserahmen enthält, in die Zielzellen transfiziert und diese nach 24 h mit einer Adenovirus-Deletionsmutante, dem der betreffende Leserahmen entfernt wurde, infiziert. Mit dieser Methode können zwar die Auswirkungen einer Deletion oder Mutation abgeschätzt, jedoch keine genaueren Aussagen getroffen werden, da die Stöchiometrie der beteiligten Proteine nicht den natürlichen Bedingungen entspricht.

Die Herstellung und Analyse von Adenoviren mit zielgerichtet mutagenisierten Genen und einem unverfälschten typspezifischen viralen Genom erlaubt es dagegen die Auswirkungen von Mutationen im richtigen viralen Kontext zu beurteilen. Aus diesem Grund wurde für Ad5 ein System etabliert (Groitel und Dobner, 2007), bei dem die schnelle, zielgerichtete Mutagenese der E1- bzw. der E4-Region mit der direkten Klonierung in das 36 kb lange Ad5-Genom kombiniert wurde (Abb. 18).

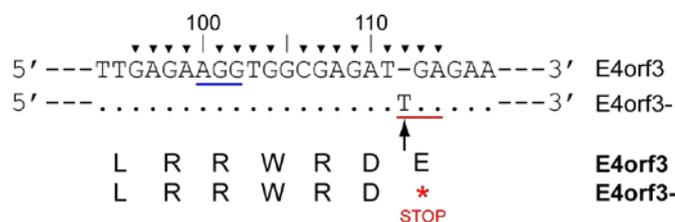


**Abb. 18 Klonierungsschema zur Herstellung punktmutierter E4-Virusmutanten**

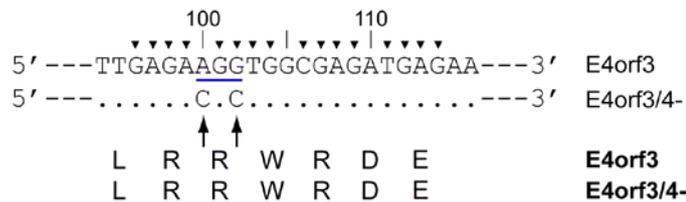
In die E4-Region (gelb; pE4-1155) konnten mit Hilfe des *QuikChange*<sup>®</sup> *Site-Directed Mutagenesis Kits* (Stratagene) Mutationen an definierten Nukleotid-Positionen eingeführt werden (X). Anschließend wurden die mutierten Plasmide über *SfiI* in das Ad5-Bacmid (pH5pg4100ΔE4) rückklontiert. Die daraus resultierenden Plasmide wurden nach ihrer Nummer in der Stammsammlung der Arbeitsgruppe archiviert. Die XXX in pH5pm4XXX stehen für die Zahlen 001 bis 999. Die Bacmide wurden danach mit *PacI* linearisiert um den bakteriellen Vektor abzutrennen und die Virusgenomenden (LTR's) freizulegen. Anschließend wurden die linearisierten Bacmide in die Zelllinie 2E2 transfiziert (4.2.4.2). Aus den Zellen konnten dann nach mehreren Infektionsrunden infektiöse Viruspartikel isoliert werden.

Um Hinweise auf Funktionen des viralen Fusionsproteins E4orf3/4 im produktiven Infektionszyklus von Ad5 zu erhalten, wurden zunächst punktmutierte Ad5-Virusmutanten hergestellt, die entweder kein E4orf3 (H5pm4150), E4orf4 (H5pm4166) oder E4orf3/4 (H5pm4163) exprimieren. Die einzelnen Mutanten wurden dabei nicht durch Deletion ganzer E4-Leserahmen erzeugt, sondern durch Punktmutationen, die entweder den Verlust eines Startcodons oder die Generierung von Stopcodons innerhalb eines der oben genannten E4-Leserahmen zur Folge hatten (3.3.1 und 3.3.4) (Abb. 19).

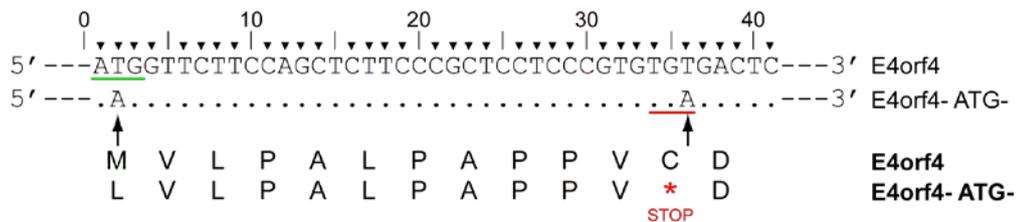
A



B



C



**Abb. 19** Detaillierte Darstellung der eingeführten Mutationen

(A) Insertion eines T in den Leserahmen E4orf3 nach der Spleißdonorstelle D2a (→) führt zu einem STOP (→) in der E4orf3 Sequenz. (B) Mutation der Spleißdonorstelle D2a (→) ohne die Aminosäuresequenz von E4orf3 zu verändern, verhindert das Spleißen der E4orf3/4 mRNA. (C) Mutation des Startcodons (→) von E4orf4 und der Austausch eines T → A führt zu einem STOP (→) in der E4orf4 Sequenz. Die Zahlen zeigen die Lage der Mutationen in der Nukleotidsequenz der jeweiligen E4-Leserahmen an. Unter der jeweiligen DNA-Sequenz ist ein Ausschnitt aus der Aminosäure-Sequenz der entsprechenden E4-Genprodukte (**Fettdruck**) mit den Auswirkungen der eingeführten Nukleotiden gezeigt. Die Pfeile markieren die Mutationen in der DNA-Sequenz.

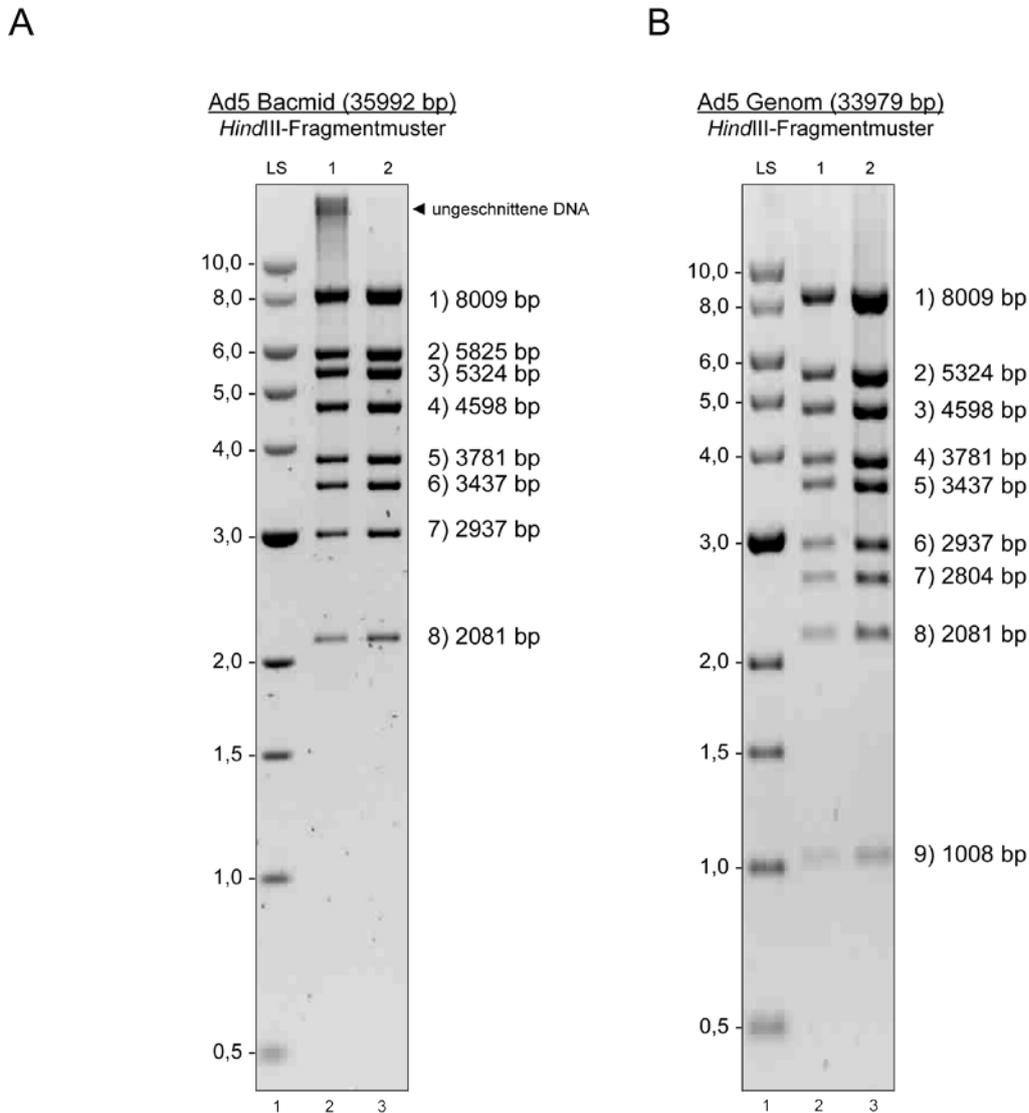
Um mögliche redundante Funktionen dieser drei E4-Proteine im lytischen Infektionszyklus von Ad5 aufzudecken, wurden zusätzlich Virusmutanten generiert, welche Kombinationen dieser Nullmutationen (H5pm4164, H5pm4183, H5pm4184) bzw. alle drei tragen (H5pm4195)

(Abb. 19).

Ausgehend von der Überlegung, dass in der E4orf3-negativen Ad5-Mutante nur die Synthese des Volllänge Proteins E4orf3 verhindert werden soll, nicht aber die des Spleißprodukts E4orf3/4, wurden zunächst spezielle Mutageneseprimer entworfen (3.3.1). Analog dazu wurde die Ad5 E4orf3/4 Nullmutante (H5pm4163) generiert. Bei dieser Mutante soll lediglich das Spleißen der E4orf3/4 mRNA verhindert werden. Durch diese Strategie soll weder die mRNA für das E4orf3-Volllängeprotein bzw. das Spleißmuster der gesamten E4-Region beeinflusst werden (Abb. 19).

Die mutagenisierten E4-Box-Plasmide wurden chemisch in *E. coli* DH5a transformiert und amplifiziert (4.1.2.2). Zur Überprüfung der eingeführten Mutationen in die entsprechenden E4-Leserahmen wurden die Plasmide sequenziert.

Bevor die mutagenisierten E4-Box Plasmide in das Ad5-Restgenom (pH5pg4100ΔE4) ligiert werden konnten, musste das Wildtyp-Ausgangsbacmid (3.3.5), überprüft werden. Dazu wurde es mit dem Enzym *Hind*III verdaut, die entstandenen Restriktionsfragmente in einem analytischen 0,6%igem-Agarosegel (4.5.4) aufgetrennt und mit dem für Ad5-Bacmide typischen Restriktionsmuster abgeglichen (Abb. 20, A). Dies ist notwendig, da in der E1B-Region eine TIS (Transposon-Integrationsstelle) vorkommt und dadurch das Transposon 10 (*tn10*) an dieser Stelle integrieren kann. Des Weiteren konnte durch die *Hind*III-Kontrollspaltung überprüft werden, in welchem qualitativen Zustand sich die DNA befindet und, ob möglicherweise Deletionen bei dessen Amplifikation aufgetreten sind (Abb. 20, A).



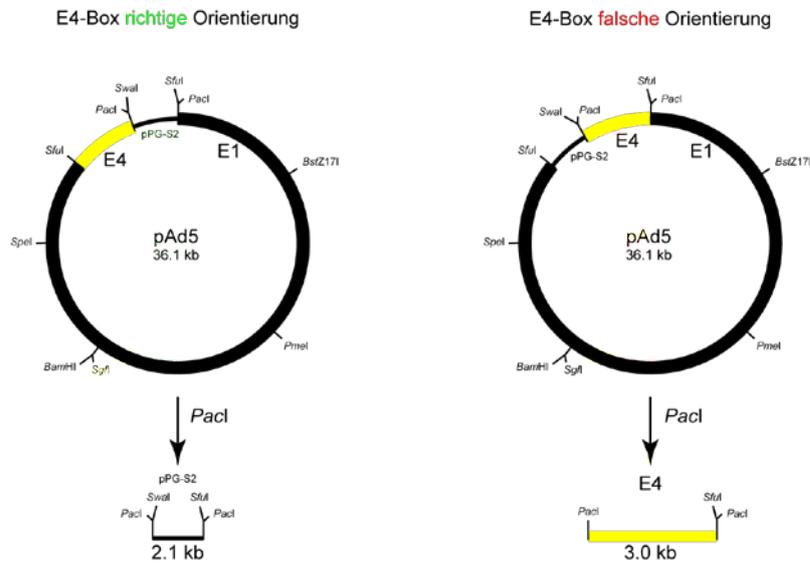
**Abb. 20** *Hind*III-Restriktionsmuster von Ad5

Abgebildet sind Restriktionsmuster *Hind*III-verdauter Ad5-DNA nach Auftrennung in 0,6%igen-Agarose-gele (40 V, 16 h; 4.5.4). (A) Typisches *Hind*III-Fragmentmuster für Ad5 Bacmid-DNA. (B) *Hind*III-Fragmentmuster aus Ad5 Viruspartikeln isolierter DNA.

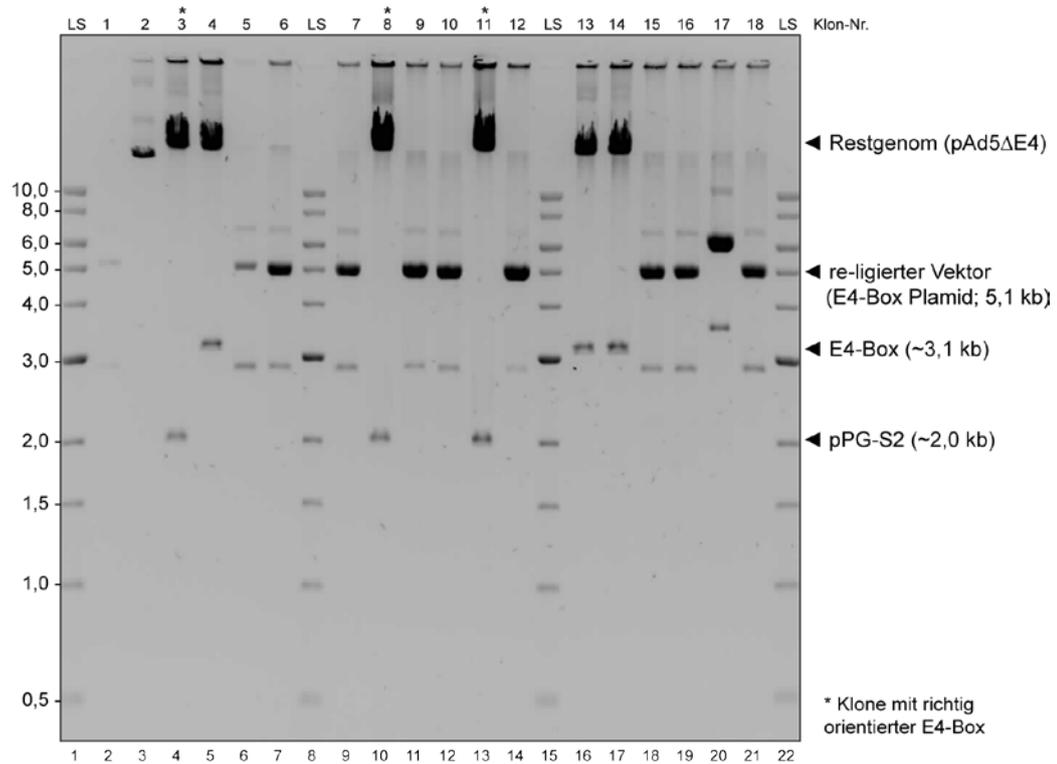
Damit die mutagenisierten E4-Boxen in das Ad5-Restgenom eingebaut werden konnten, musste die ursprüngliche E4-Box zuvor aus dem Ad5-Genom entfernt werden. Dazu wurde die wt Ad5 Bacmid-DNA mittels *Sfu*I verdaut, die Fragmente in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt und das Ad5-Restgenom aus dem Gel isoliert (4.5.5). Danach konnten die mutierten E4-Boxen mit dem Ad5-Restgenom enzymatisch ligiert (4.5.7.2) und durch chemische Transformation (4.1.2.2) in XL2-Blue-Zellen eingebracht werden.

Die Identifikation der potenziell richtigen Klone (4.5.7.3) erfolgte durch gelelektrophoretische Auftrennung *Pac*I-verdauter Bacmid-DNA (Abb. 21, A). *Pac*I baut dabei die Ad5-DNA so ab, dass je nach Orientierung E4-Bereich unterschiedlich große Fragmente entstehen (Abb. 21).

A



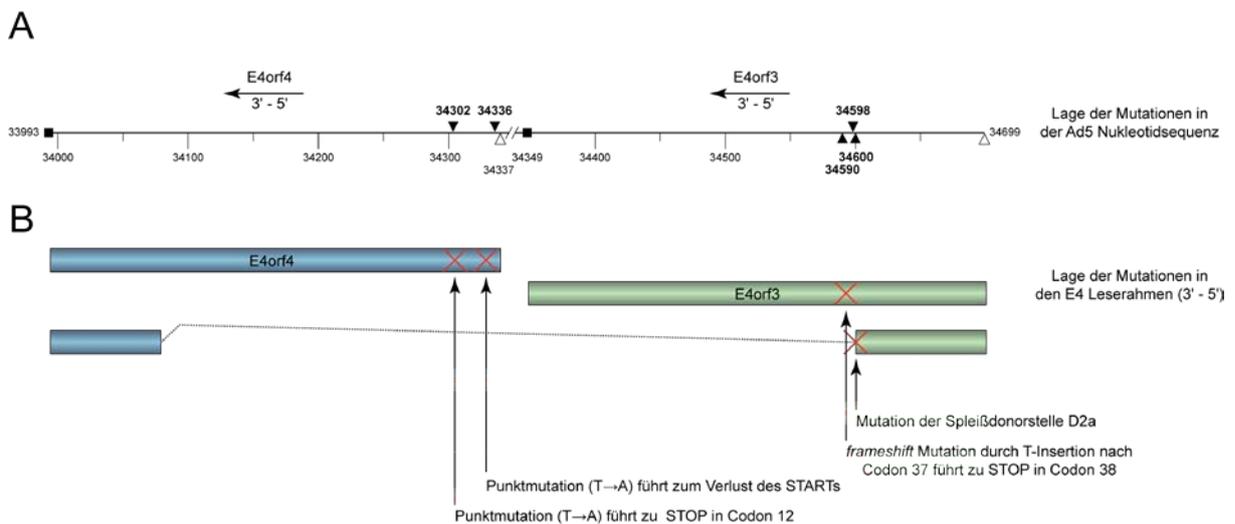
B



**Abb. 21 Restriktionsmuster *PacI*-verdauter Bacmid-DNAs zur Identifikation potenziell richtiger Klone**

(A) Schematische Darstellung der Bacmid-Fragmente bei richtig bzw. falsch orientiert Ligation der E4-Box nach *PacI*-Spaltung. (B) Gelelektrophoretische Auftrennung *PacI*-verdauter Bacmid-DNA zur Identifikation potenziell richtiger Klone.

Mittels *PacI* wurde anschließend der bakterielle Vektoranteil von den neu generierten Bacmiden abgetrennt und die viralen Genomenden (LTR's) freigelegt. Es folgte eine Transfektion der linearisierten Ad5-DNA (4.2.4.2) in 2E2-Zellen (3.1.3). Mit Hilfe dieser Zelllinie konnten infektiöse Viruspartikel hergestellt und nach einigen Infektionsrunden hochtitrige Virusstocks erzeugt werden (4.4.2). Um auf DNA-Ebene überprüfen zu können, ob die virale DNA intakt ist und die neu eingeführten Mutationen trägt, wurden Viruspartikel über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt und aufkonzentriert (4.4.3), die DNAs isoliert (4.5.2) und wichtige Bereiche des viralen Genoms sequenziert. Mit Hilfe eines *HindIII*-Restriktionsverdau wurden zusätzlich die Genome auf unerwünschte Rearrangements überprüft (vgl. Abb. 20, B).



**Abb. 22 Übersicht der generierten Ad5 E4-Virusmutanten**

(A) Darstellung der Position der eingeführten Punktmutationen (▼▲) in der Ad5 Nukleotidsequenz. △ Start-Met des jeweiligen Leserahmens. ■ Stopcodon des jeweiligen Leserahmens. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung entsprechend der Orientierung der E4-Region auf dem Ad5 Genom an. (B) Position der eingeführten Punktmutationen in die Leserahmen von E4orf3 und E4orf4 (×).

Durch unterschiedliche Kombinationen der einzelnen Mutationen (Abb. 19; Abb. 22) sind die in Tab. 3 zusammengefassten Einfach-, Doppel- und Dreifach-Nullmutanten generiert worden.

Tab. 3 Übersicht über die neu generierten Ad5 E4-Mutanten und Bezeichnung des Phänotyps

Virus	Bezeichnung	Phänotyp		
		E4orf3	E4orf3/4	E4orf4
H5pg4100	Ad5 wt	+	+	+
H5pm4150	Ad5 E4orf3 <sup>-</sup>	-	+	+
H5pm4163	Ad5 E4orf3/4 <sup>-</sup>	+	-	+
H5pm4164	Ad5 E4orf3 <sup>-</sup> 3/4 <sup>-</sup>	-	-	+
H5pm4166	Ad5 E4orf4 <sup>-</sup>	+	+	-
H5pm4183	Ad5 E4orf3 <sup>-</sup> 4 <sup>-</sup>	-	+	-
H5pm4184	Ad5 E4orf4 <sup>-</sup> 3/4 <sup>-</sup>	+	-	-
H5pm4195	Ad5 E4orf3 <sup>-</sup> 4 <sup>-</sup> 3/4 <sup>-</sup>	-	-	-

Alle hier neu generierten Ad5 Virusmutanten (Abb. 22) wurden sequenziert und zeigten das typische *Hind*III-Restriktionsmuster (vgl. Abb. 20, B).

## 5.6 Charakterisierung der Ad5 E4-Virusmutanten

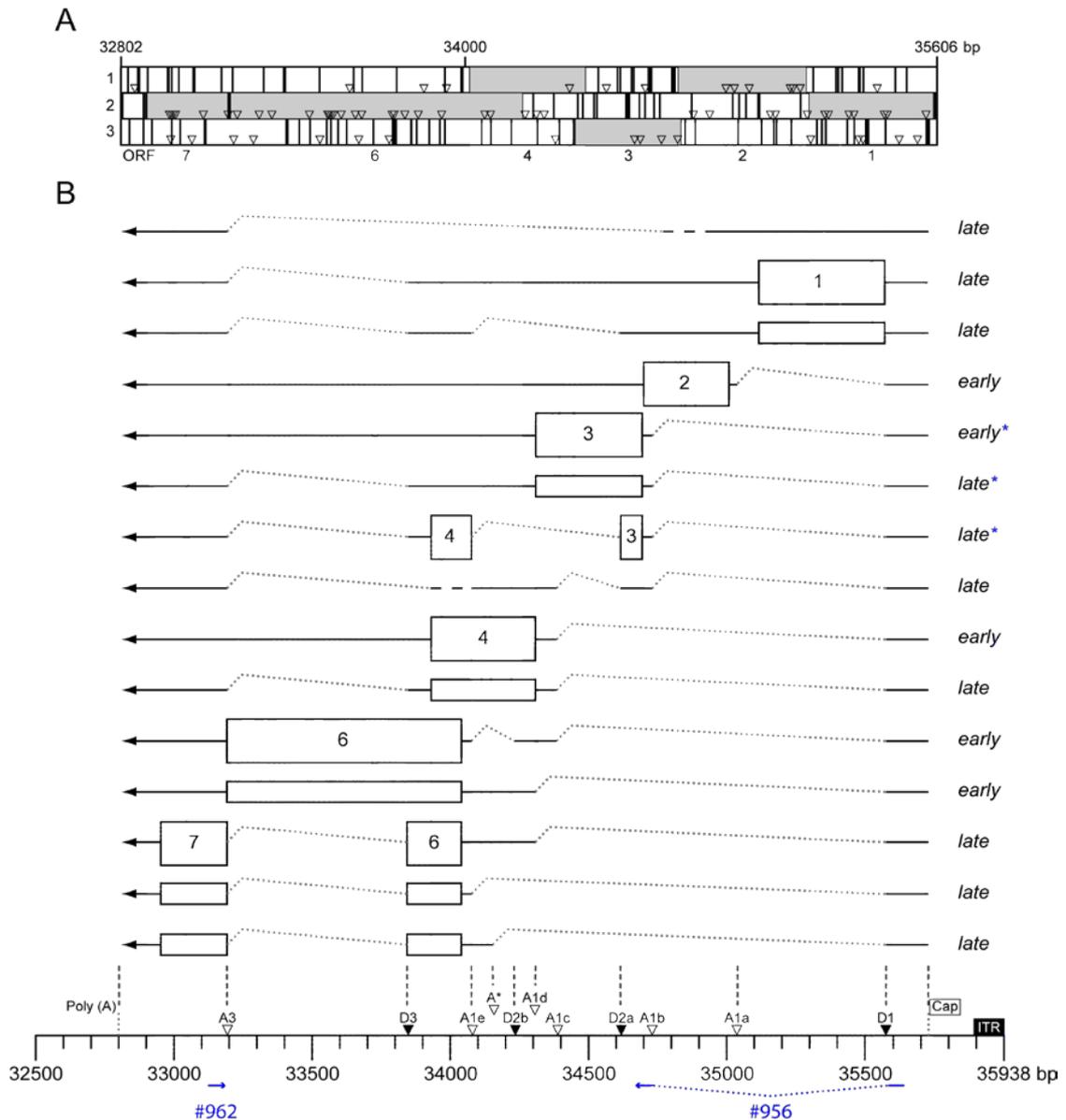
Um die neu eingeführten Nullmutationen einzelner E4-Leserahmen auch auf Proteinebene zu charakterisieren und um Auswirkungen dieser Mutationen auf die Expression weiterer adenoviraler Proteine zu untersuchen wurden zunächst humane A549-Zellen infiziert und die virale Proteinexpression im zeitlichen Verlauf der Infektion mittels *Western Blot* analysiert. Des Weiteren wurden die Virusmutanten auf Defekte in der DNA-Replikation und die Produktion von Nachkommenviren untersucht.

### 5.6.1 Nachweis der E4orf3/4 mRNA

Zunächst galt es die mRNA von E4orf3/4 reproduzierbar nachzuweisen, deren Expression im zeitlichen Verlauf der Virusinfektion zu analysieren und zu bestätigen, dass die Spleißdonorstelle D2a durch die oben bereits beschriebene Mutation nicht mehr genutzt wird. Analog zum Nachweis der Ad2 E4orf3/4-mRNA (Virtanen *et al.*, 1984) wurden HeLa-Zellen mit Ad5 wt (H5pg4100) und Ad5 E4orf3/4<sup>-</sup> (H5pm4163) infiziert (4.4.5) und zu entsprechenden Zeitpunkten nach der Infektion geerntet (4.2.5). Anschließend wurde daraus Gesamtzell-RNA isoliert und diese in cDNA revers transkribiert (4.6.1).

Es war bereits bekannt, dass aus der E4-Region von Ad2 bzw. Ad5 bis zu 18 verschiedene

mRNA-Transkripte mit teilweise ähnlicher Länge durch alternatives Spleißen einer ca. 2800 nt langen Vorläufer-mRNA gebildet werden, die für sieben E4-Genprodukte kodieren (Abb. 23; Virtanen *et al.*, 1984; Abb. 23; Cutt *et al.*, 1987; Dix und Leppard, 1993; Täuber und Dobner, 2001a; Täuber und Dobner, 2001b).



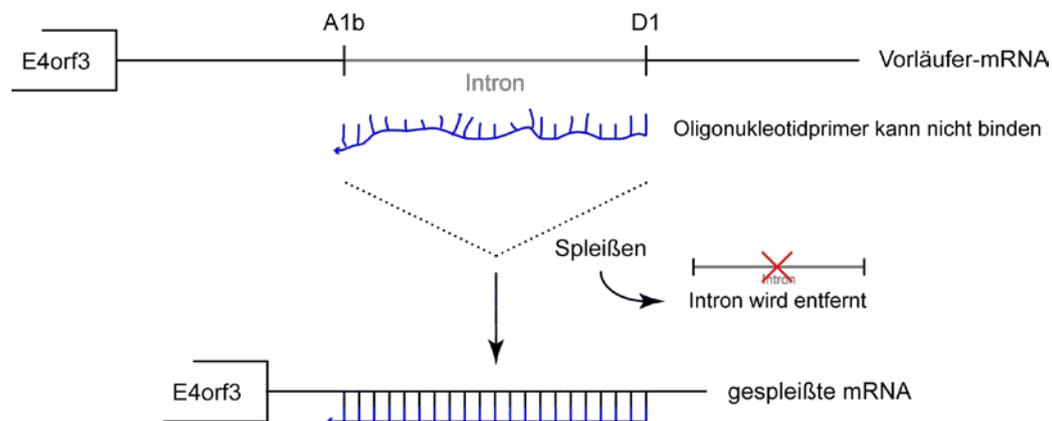
**Abb. 23 Ad2/Ad5 E4-Transkriptionseinheit**

(A) Abgebildet sind die drei Leseraster (1, 2 und 3) der E4-Region auf dem Sinn-Strang von Position 35606 (*cap-site*) bis 32802 (Poly-A-Signal). Die grau unterlegten Rechtecke symbolisieren die kodierenden Sequenzen der offenen Leseraster ORF1 bis ORF7. Stopcodons sind durch senkrechte Linien (|) und Methionin-Codons durch (▽) markiert. (B) Die verschiedenen E4-mRNA-Transkripte sind durch Linien und Pfeile angedeutet. Introns sind durch eine gestrichelte Linie und die kodierenden Regionen durch offene Rechtecke dargestellt. *late* und *early* auf der rechten Seite geben die Klasse der zeitlich ge-

bildeten mRNA-Spezies an. Unten ist die Lage der individuellen offenen Leserahmen (1 - 7) und die Kombinationen der Spleißstellen (Donor ▼; Akzeptor ▽) relativ zu ihrer Position in der Ad5-Nukleotidsequenz gezeigt. Die blauen Pfeile (→) markieren die Binderegion der Primer #956 und #962 (3.3.1), die zum Nachweis der E4orf3/4- und E4orf3-mRNAs (\*) verwendet wurden. (zusammengefasst nach: Virtanen *et al.*, 1984; zusammengefasst nach: Cutt *et al.*, 1987; Dix und Leppard, 1993; Täuber und Dobner, 2001a; Täuber und Dobner, 2001b)

Eine Schwierigkeit beim gezielten Nachweis der E4orf3/4-mRNA bestand darin, geeignete Oligonukleotidprimer zu entwerfen um nur die mRNA von E4orf3/4 mittels PCR zu amplifizieren. Analysen der E4-Nukleotidsequenz sowie der mRNA-Spezies ergaben, dass es nicht möglich ist geeignete Primer herzustellen, um einzig die E4orf3/4-mRNA aus virusinfizierten Zellen zu amplifizieren. Jedoch sollte mit Hilfe eines Spleißstellen-übergreifenden Primers (3.3.1), der sich aus Sequenzabschnitten *upstream* der Spleißdonorstelle D1 und *downstream* der Akzeptorstelle A1b zusammensetzt möglich sein, ausschließlich drei von 18 E4-mRNA-Transkripten zu amplifizieren (Abb. 23 und Abb. 24). Auf Grundlage der bekannten Sequenzen ist dabei eine Bande bei 1575 bp für das frühe (*early*) E4orf3-Transkript, eine bei 863 bp für die späte E4orf3-mRNA sowie eine dritte Bande bei 342 bp für das E4orf3/4 mRNA-Transkript zu erwarten (Abb. 23, B).

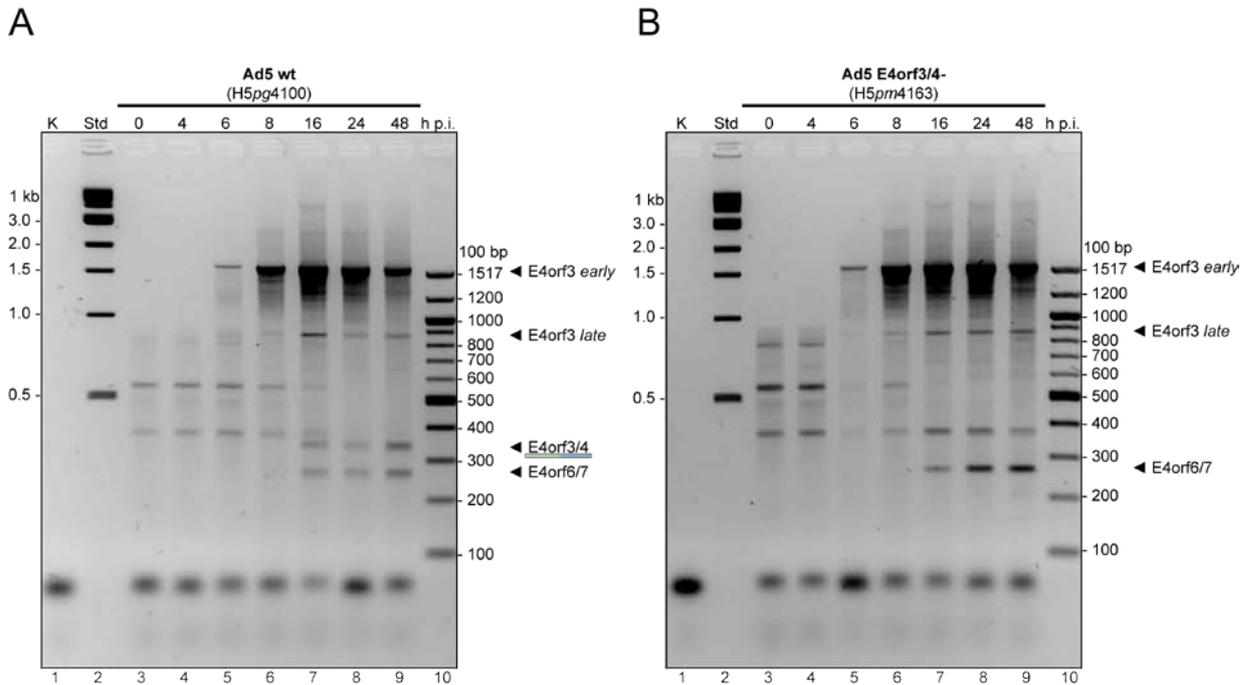
In Abb. 24 ist im Detail gezeigt, wie die E4orf3- bzw. E4orf3/4-Transkripte nach dem Spleißvorgang auf cDNA-Ebene zu nachweisbaren Mengen amplifiziert wurden.



**Abb. 24 Prinzip der Spleißstellen-übergreifenden PCR-Amplifikation**

Ein Oligonukleotidprimer, der direkt angrenzende Sequenzabschnitte *upstream* der Spleißdonorstelle D1 und *downstream* der Spleißakzeptorstelle A1b in sich vereint (#956; 3.3.1), kann nur an richtig gespleißte mRNA-Transkripte binden.

Nach Isolierung der Gesamtzell-RNA und reverser Transkription (4.6) wurden die Proben in einem 1,5%igem Agarosegel aufgetrennt (4.5.4) und die PCR-Fragmentmuster miteinander verglichen (Abb. 25).



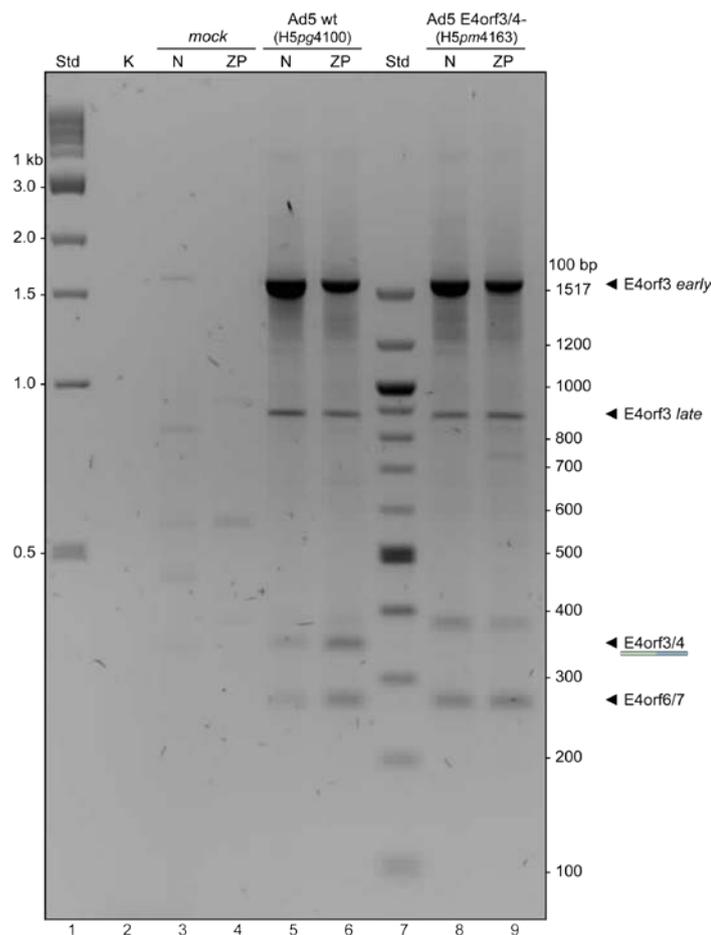
**Abb. 25 Nachweis der Ad5 E4orf3/4-mRNA**

HeLa-Zellen wurden mit einer moi von 10 ffu/Zelle infiziert (4.4.5) und zu den angegebenen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet (4.2.5), deren Gesamtzell-RNA isoliert und in cDNA revers transkribiert (4.7). Anschließend wurden mittels PCR und der Primer #956 und #962 mRNA-Spezies amplifiziert (4.5.6) und in einem 1,5%igen Agarosegel entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt (4.5.4). Abkürzungen: K: Negativkontrolle (Wasserprobe); 0: *mock*-infizierte Zellen; 4 – 48: Zeitpunkte nach der Infektion (h p.i.); Std: Nukleotid-Längenstandard. (A) PCR-Fragmentmuster von Ad5 wt (H5pg4100) infizierten HeLa-Zellen. (B) PCR-Fragmentmuster von Ad5 E4orf3/4- (H5pm4163) infizierten HeLa-Zellen.

Entgegen der Theorie wurden mehr DNA-Fragmente als erwartet amplifiziert (Abb. 25). Neben den Signalen für das frühe (*early*) und späte (*late*) mRNA-Transkript von E4orf3 (Abb. 23; 24) scheinen die verwendeten Oligonukleotidprimer auch unspezifisch an zelluläre DNA in nicht-infizierten HeLa-Zellen zu binden (Abb. 25, Spur 3). Erwartungsgemäß zeigen beide Gelbilder nur einen einzigen Unterschied in der Anzahl der detektierten PCR-Fragmente (Abb. 25; A, B). Etwa auf der Höhe von 350 bp ist in wt-Ad5-infizierten Zellen ein Signal zu sehen, das für die E4orf3/4-mRNA (342 bp) zu erwarten ist (Abb. 25, A, Spuren 7 – 8), während dieses in Ad5 E4orf3/4-infizierten Zellen nicht erscheint (Abb. 25, B, Spuren 7 – 8). Dies weist darauf hin, dass durch die Mutation der Spleißdonorstelle D2a nur die Synthese der gesuchten E4orf3/4-mRNA verhindert wird und vermutlich keine neuen alternativ gespleißten E4-mRNA-Spezies gebildet werden. Dies ist ein erster Hinweis auf die Existenz der E4orf3/4-mRNA in Ad5-infizierten Zellen. Um sicher zu gehen, dass es sich hierbei tatsächlich um die gesuchte mRNA von Ad5 E4orf3/4 handelt, wurden sämtliche DNA-Banden aus den Agarosegelen isoliert und anschließend sequenziert. Dadurch konnte erstmals die mRNA

des adenoviralen Fusionsproteins E4orf3/4 in Ad5-infizierten Zellen zweifelsfrei bestätigt werden. Die Ad5 E4orf3/4-mRNA wird in Ad5-infizierten Zellen analog zum Ad2 E4orf3/4-Transkript synthetisiert. Aus den Sequenzanalysen ergab sich außerdem, dass mit den verwendeten Primern zusätzlich das virale E4orf6/7-Transkript amplifiziert wurde.

Um zu bestätigen, dass die Synthese des E4orf3/4-Transkripts nicht von anderen Faktoren in HeLa-Zellen abhängt, wie z. B. E6 oder E7 aus HPV, wurden ergänzende Analysen in A549-Zellen durchgeführt. Um neben der Reproduzierbarkeit des vorangegangenen Ergebnisses zusätzlich zu überprüfen, ob die gespleißte E4orf3/4-mRNA auch aus dem Zellkern ins Zytoplasma exportiert wird, wurde die Gesamtzell-RNA bei der Isolation in eine nukleäre und eine zytoplasmatische Fraktion getrennt und erst danach die reverse Transkription durchgeführt. Mit den nukleären und zytoplasmatischen cDNA-Proben wurde anschließend die Nachweis-PCR durchgeführt und die PCR-Fragmente wie oben bereits beschrieben gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 26).



**Abb. 26 Nachweis der E4orf3/4-mRNA nach nukleo-zytoplasmatischer Fraktionierung**  
 A549-Zellen wurden mit einer moi von 10 ffu/Zelle infiziert (4.4.5), 24 h p.i. geerntet (4.2.5), fraktioniert

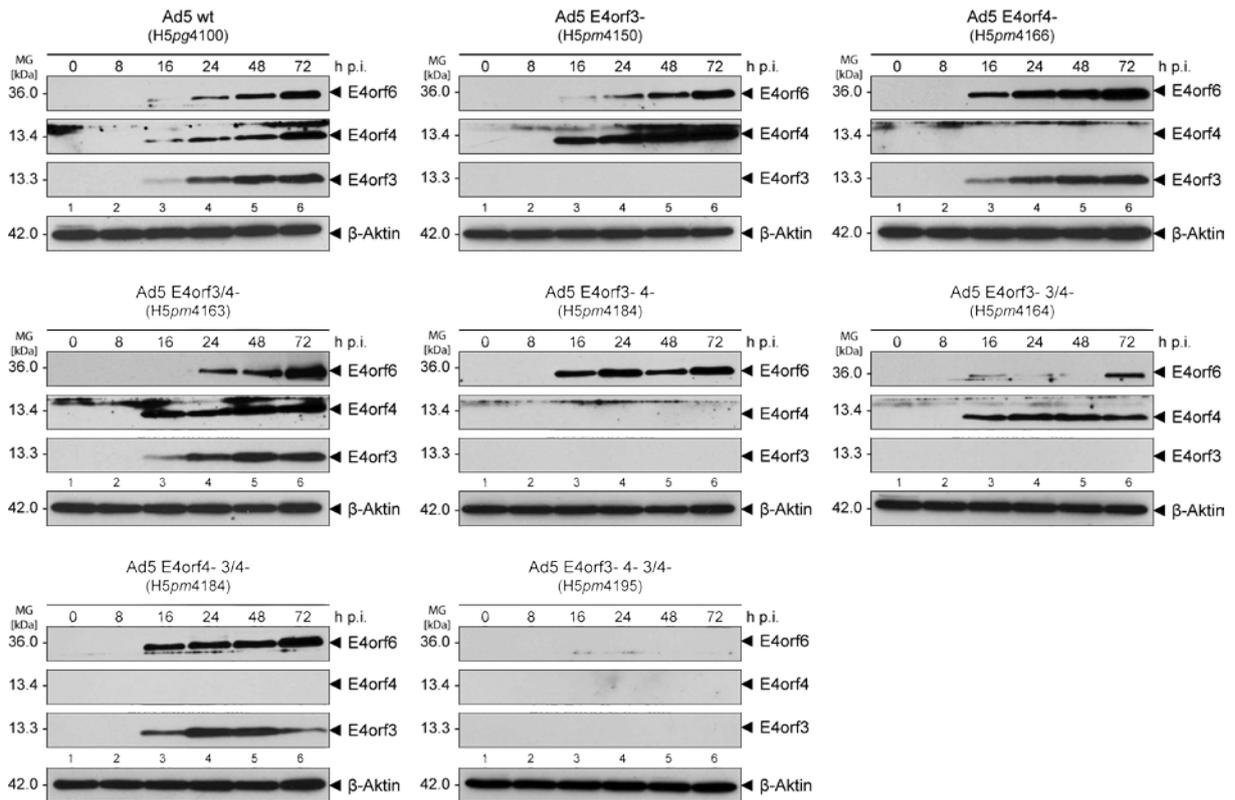
aufgeschlossen (4.6), deren Gesamtzell-RNA isoliert und in cDNA revers transkribiert (4.6). Anschließend wurden mittels PCR und der Primer #956 und #962 mRNA-Spezies amplifiziert (4.5.6) und in einem 1,5%igen Agarosegel entsprechend ihrer Länge aufgetrennt (4.5.4). Abkürzungen: *mock*: nicht-infizierte Zellen; *Std*: Nukleotid-Längenstandard, *K*: Negativ-Kontrolle mit Wasser; *N*: nukleäre Fraktion; *ZP*: zytopasmatische Fraktion.

Die Ergebnisse zeigten, dass auch in Ad5 wt infizierten A549-Zellen das E4orf3/4-Transkript nachgewiesen werden konnte (Abb. 26, Spuren 5 - 6), wohingegen es bei Ad5 E4orf3/4- infizierten Zellen erwartungsgemäß fehlt. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass das E4orf3/4-Transkript effektiv aus dem Zellkern exportiert wird, da die Signalstärke in Spur 6 stärker ist als in Spur 5 (Abb. 26).

## 5.6.2 Analysen der E4-Nullmutationen auf Proteinebene

### 5.6.2.1 *Western Blot* Analysen früher Proteine

Um die eingeführten Mutationen auch auf Proteinebene zu untersuchen bzw. deren Auswirkungen zu prüfen, wurde die Expression von E4orf3, E4orf4 und E4orf6 im zeitlichen Verlauf der Ad5-Infektion analysiert. A549-Zellen wurden dazu mit einer *moi* von 5 ffu/Zelle infiziert, zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion (h p.i.) geerntet und Gesamtzellextrakt daraus hergestellt. Adäquate Mengen wurden anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels *Western Blot* analysiert (Abb. 27).



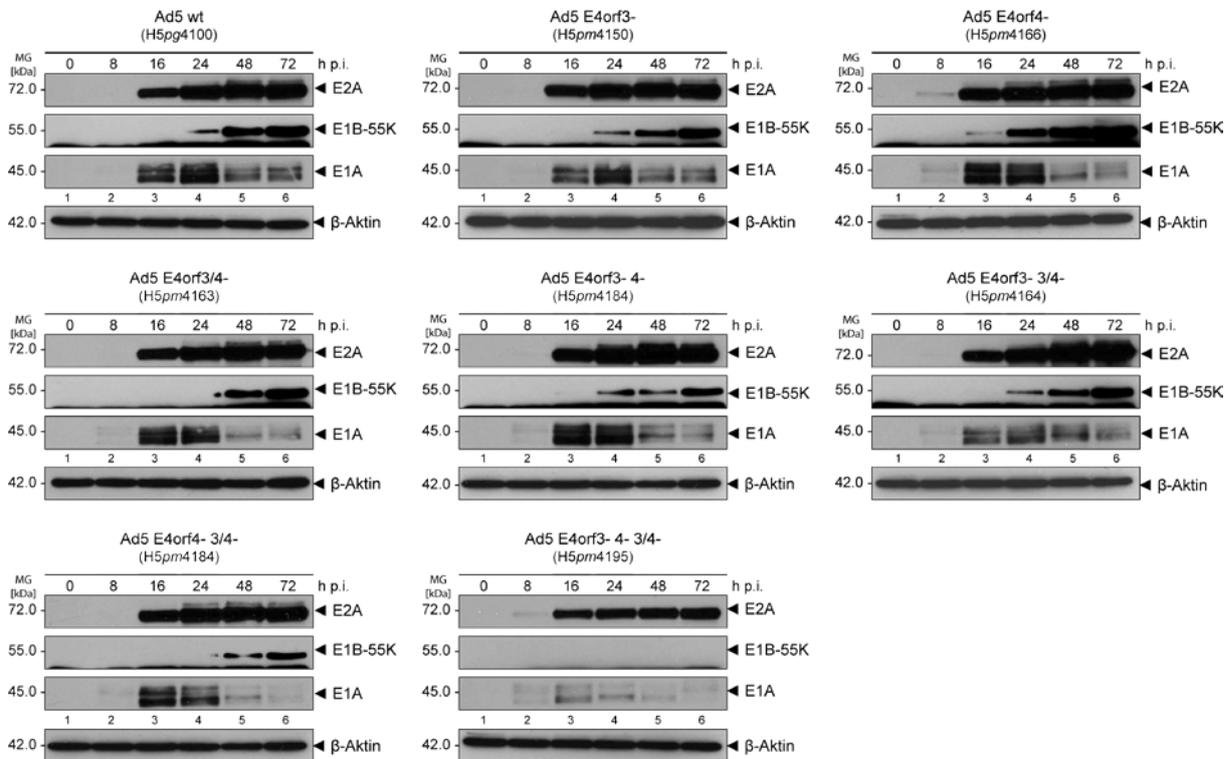
**Abb. 27 Gleichgewichtsmengen adenoviraler E4-Proteine**

A549-Zellen wurden mit Ad5 E4-Mutanten (Tab. 3) mit einer *moi* von 5 ffu/Zelle infiziert (4.4.5), zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion (h p.i.) geerntet (4.2.5) und Gesamtzellextrakt hergestellt (4.7.1). Zur Überprüfung der Expression wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt mittels 15%iger SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt (4.7.3), durch *Western Blot* auf PVDF-Membranen übertragen und mit Antikörpern gegen E4orf6, E4orf4, E4orf3, β-Aktin und entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörpern (3.4) inkubiert (4.7.4).

Durch die zeitliche Analyse der Gleichgewichtsmengen von E4orf3 und E4orf4 wurden die Nullmutationen für diese E4-Genprodukte auch auf Proteinebene bestätigt (Abb. 27). Die E4orf6-Mengen sind bei den Viren die eine E4orf4-Nullmutation tragen im Vergleich zum Ad5 wt stark erhöht (Abb. 27, oben, Spuren 3 - 6). Dies ist konsistent mit der bereits veröffentlichten Beobachtung, dass die E4orf6-Gleichgewichtsmengen in Ad5 E4orf4-negativen Virusmutanten im Vergleich zum Ad5 wt erhöht sind (Miron *et al.*, 2009). Darüber hinaus scheinen in Ad5 E4orf3- und Ad5 E4orf3/4-infizierten Zellen, die E4orf4-Mengen im Vergleich zum Ad5 wt leicht erhöht zu sein (Abb. 27, Mitte, Spuren 3 - 6). Vergleicht man die E4orf3/4-negative Virusmutante direkt mit dem Ad5 wt fällt auf, dass sowohl die E4orf4- als auch die E4orf6-Expressionsmengen in dieser Mutante erhöht sind (Abb. 27, Mitte, Spuren 4 - 6). Obwohl die Einfachmutanten Ad5 E4orf3- und Ad5 E4orf3/4- keinen Defekt in der E4orf6-Expression zeigen, exprimiert die Doppel-Nullmutante Ad5 E4orf3- 3/4- deutlich reduzierte E4orf6-Gleichgewichtsmengen (Abb. 27, Mitte, Spuren 4 - 6). Dagegen synthetisiert die Mu-

tante Ad5 E4orf4- 3/4- nahezu gleiche E4orf6- und E4orf3-Mengen wie Ad5 E4orf4-.

Neben diesen E4-Proteinen wurde auch die Expression der frühen Proteine E1A, E1B-55K und E2A im zeitlichen Verlauf der Virusinfektion untersucht (Abb. 28).



**Abb. 28 Gleichgewichtsmengen früher adenoviraler Proteine**

A549-Zellen wurden mit Ad5 E4-Mutanten (Tab. 3) mit einer *moi* von 5 ffu/Zelle infiziert (4.4.5), zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion (h p.i.) geerntet (4.2.5) und Gesamtzellextrakt hergestellt (4.7.1). Zur Überprüfung der Expression wurden jeweils gleiche Mengen Gesamtzellextrakt mittels 15%iger SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt (4.7.3), durch *Western Blot* auf PVDF-Membranen übertragen und mit Antikörpern gegen E2A, E1A, E1B-55K, β-Aktin sowie entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörpern (3.4) inkubiert (4.7.4).

Die Analysen der Gleichgewichtsmengen der frühen Proteine E1A, E1B-55K und E2A zeigen, dass die E4orf4-negative Virusmutante Ad5 E4orf4- deutlich höhere E1B-55K- und E2A-Mengen als der Wildtyp exprimiert (Abb. 28, oben). Obwohl E2A in allen hier verwendeten Ad5-Mutanten stark exprimiert wird, sind die E2A-Gleichgewichtsmengen in der Dreifach-Nullmutante Ad5 E4orf3- 4- 3/4- reduziert. Während bei den Einfach- und Doppel-Nullmutanten die E2A-Mengen im zeitlichen Verlauf der Infektion akkumulieren, scheinen diese in der Dreifachmutante konstant zu bleiben (Abb. 28, unten). Des Weiteren fällt auf, dass die Dreifachmutante bei der Expression von E1B-55K einen starken Defekt zeigt. Im Gegensatz zu den anderen E4-Mutanten, die ähnliche Mengen an E1B-55K exprimieren, ist bei Ad5 E4orf3-

4<sup>3/4</sup> kein E1B-55K detektierbar (Abb. 28, unten). Die Mutante Ad5 E4orf4<sup>3/4</sup> zeigt ebenfalls einen Defekt in der E1B-55K-Expression verglichen zum Ad5 wt (Abb. 28, Mitte). Die Mutanten Ad5 E4orf3<sup>3/4</sup> und Ad5 E4orf3<sup>4<sup>3/4</sup></sup> sind stark in der E1A-Expression beeinträchtigt. Während beim Ad5 wt und den restlichen E4-Mutanten die E1A-Mengen bis 24 h p.i. akkumulieren und im weiteren Verlauf der Infektion abnehmen, scheinen diese bei der Mutante Ad5 E4orf3<sup>3/4</sup> langsamer anzusteigen. Im Vergleich dazu, wird E1A in der Dreifach-Nullmutante zwar exprimiert, jedoch in wesentlich geringeren Mengen als bei den anderen Ad5-Mutanten. Außerdem können bei Ad5 E4orf3<sup>4/4</sup> und Ad5 E4orf4<sup>3/4</sup>, im Vergleich zu den anderen Ad5 E4-Mutanten 48 h p.i. und 72 h p.i. leicht reduzierte E1A-Mengen beobachtet werden (Abb. 28, Mitte). Möglicherweise beeinflusst E4orf3/4 die E1A-Expression, wobei durch das gleichzeitige Fehlen eines der Volllänge E4-Proteine E4orf3 bzw. E4orf4 dieser Effekt zusätzlich verstärkt wird.

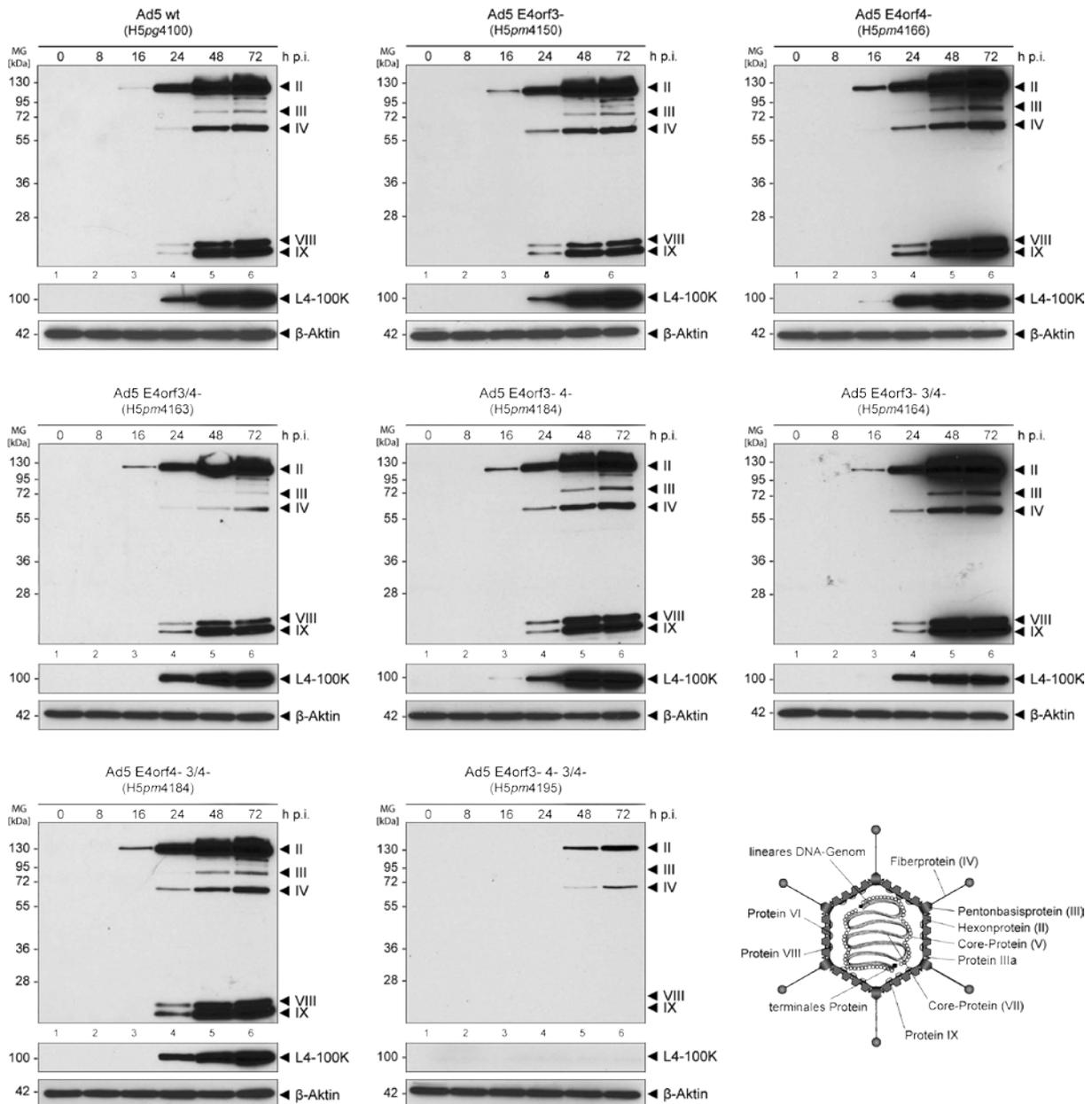
### 5.6.2.2 *Western Blot Analysen später Proteine*

Nach der Analyse einiger früher adenoviraler Proteine wurden die Ad5 E4-Mutanten auch hinsichtlich der Expression später Proteine untersucht.

Virusmutanten, denen ein funktionelles E1B-55K-Protein fehlt, zeigen schwere Defekte bei der Produktion später viraler Strukturproteine und Nachkommenviren. Dies hängt damit zusammen, dass die späten viralen mRNAs nicht mehr effizient vom Kern ins Zytoplasma transportiert werden (Babich *et al.*, 1983; Babiss und Ginsberg, 1984; Babiss *et al.*, 1985; Pilder *et al.*, 1986). Zudem können die viralen Transkripte dort nicht mehr bevorzugt an Ribosomen translatiert werden (Beltz und Flint, 1979).

Des Weiteren gibt es Hinweise auf eine Interaktion zwischen E1B-55K und dem adenoviralen L4-100K Protein, wobei E1B-55K über diese Wechselwirkung einen Einfluss auf die selektive Translation später viraler Transkripte ausübt (Koyuncu, 2009). Da die Mutante Ad5 E4orf3<sup>4<sup>3/4</sup></sup> keine nachweisbaren E1B-55K-Mengen exprimiert (Abb. 28, unten), zeigt diese vermutlich auch einen Defekt in der Synthese später Proteine.

Für die Untersuchung der Synthese der viralen Strukturproteine sowie der L4-100K-Expression wurde die Zelllinie A549 mit den E4-Virusmutanten infiziert (4.4.5) und zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet (4.2.5). Zum Nachweis der späten viralen Proteine wurden *Western Blot*-Analysen durchgeführt (Abb. 29).



**Abb. 29**     **Synthese später viraler Proteine**

A549-Zellen wurden mit den verschiedenen Ad5 E4-Virusmutanten infiziert (moi 5 ffu/Zelle) (4.4.5) und zu den angegebenen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet (4.2.5). Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht infiziert (*mock*). Es wurden je 25 µg Gesamtzelleextrakt über 12%ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Der Nachweis erfolgte mit dem Kaninchen-Serum  $\alpha$ -late, das für verschiedene virale Capsidproteine spezifisch ist (3.4). Die Expression einiger viraler Strukturproteine ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Die römischen Ziffern beziehen sich auf die Bezeichnung der verschiedenen Polypeptide (Maizel *et al.*, 1968). II: Hexonprotein (120 K); III: Pentonbasisprotein (85 K); IV: Fiberprotein (62 K); VI, VIII und IX: Hexon-assoziierte Proteine (26 K, 13 K und 12 K).

Wie vermutet, zeigt die Dreifach-Nullmutante Ad5 E4orf3- 4- 3/4- einen gravierenden Defekt in der Expression später Strukturproteine (Abb. 29, unten). Konsistent zur Expression früher Proteine (Abb. 27; 28), werden auch die späten Strukturproteine in der Ad5 E4orf4-Mutante

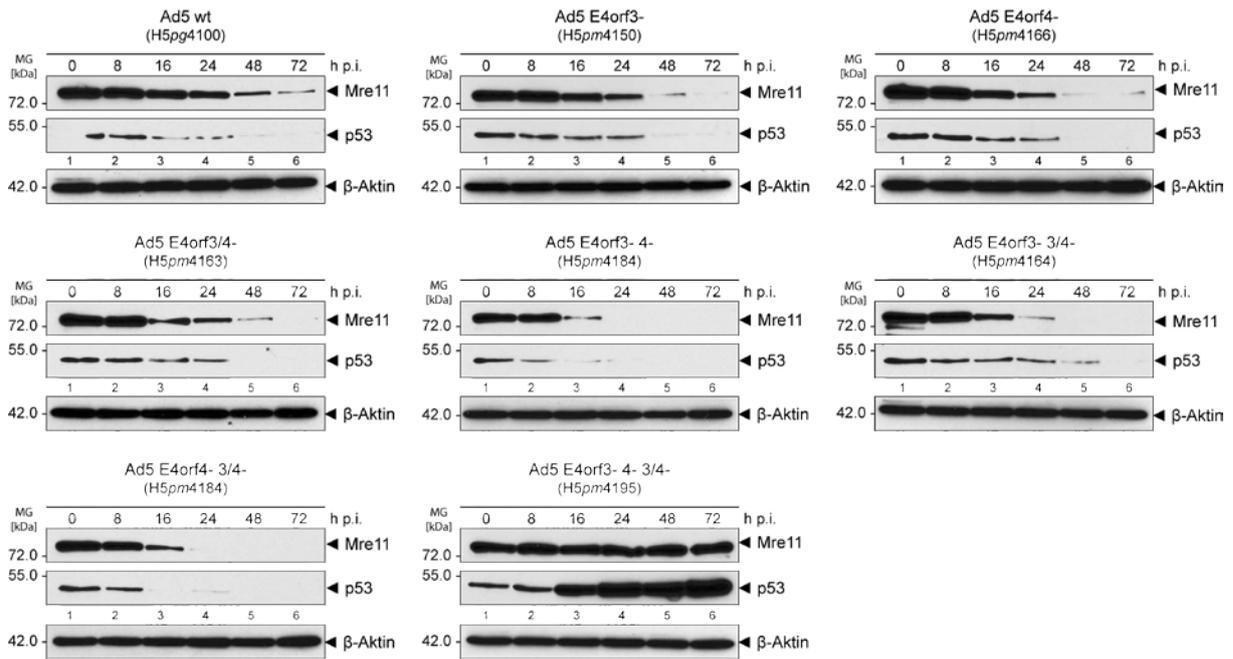
stärker exprimiert als beim Ad5 wt (Abb. 29, oben). Obwohl die Doppelmutante Ad5 E4orf3-4 negativ für E4orf3 und E4orf4 ist, exprimiert diese wt-ähnliche Mengen später Proteine. Vergleicht man diese Mutante mit der dreifach-negativen Virusmutante Ad5 E4orf3-4-3/4 wird deutlich, dass der stark defekte Phänotyp der Dreifachmutante allein durch das zusätzlichen Fehlen von E4orf3/4 verursacht wird. Dieses Ergebnis impliziert, dass E4orf3/4 eine mögliche Redundanz mit E4orf3 und E4orf4 besitzt und deshalb bei der Dreifach-Nullmutante diesen stark defekten Phänotyp hervorruft. Zusätzlich zur Expression der späten Strukturproteine wurde die Synthese von L4-100K untersucht. Auffällig ist auch hier, dass der Ad5 wt und alle E4-Virusmutanten ähnliche L4-100K-Gleichgewichtsmengen exprimieren und diese im zeitlichen Verlauf der Infektion akkumulieren. Bei der Doppelmutante Ad5 E4orf4-3/4 sind die L4-100K-Mengen etwas reduziert (Abb. 29, Mitte), obwohl die Strukturproteine etwas stärker als beim Ad5 wt exprimiert werden. Daneben ist die dreifach-negative Mutante Ad5 E4orf3-4-3/4 auch in der Expression von L4-100K stark defekt (Abb. 29, unten). Möglicherweise verursacht das gleichzeitige Fehlen von E4orf3, E4orf4 und E4orf3/4 eine Störung der Genexpression früher wie auch später Proteine.

### 5.6.3 Abbau von p53 und Mre11

Eine wichtige Funktion des E1B-55K-Proteins ist die der Abbau des zellulären Tumorsuppressors p53 in Kooperation mit E4orf6 (Grand *et al.*, 1994; Querido *et al.*, 1997; Ridgway *et al.*, 1997; Steegenga *et al.*, 1998). Das E1B-55K-Protein bildet zusammen mit E4orf6 und einer Reihe weiterer zellulärer Proteine eine SCF-ähnliche E3-Ubiquitinligase (Cullin-5, Rbx1/RCO1/Hrt1, Elongin B und C), deren Funktion die Ubiquitylierung von Proteinen ist (Querido *et al.*, 2001; Harada *et al.*, 2002; Blanchette *et al.*, 2004).

Neben p53 konnte auch das zelluläre Mre11-Protein als Interaktionspartner von E1B-55K identifiziert werden, das ebenfalls proteasomal abgebaut wird. Damit wird die Konkatemisierung der doppelsträngigen viralen DNA-Genome durch den MRN- (Mre11/Rad50/ Nbs1) Komplex verhindert (Stracker *et al.*, 2002).

Da die verschiedenen Ad5 E4-Nullmutanten Unterschiede in der Expression von E1B-55K und E4orf6 aufweisen, wurde zusätzlich deren Fähigkeit p53 und Mre11 abzubauen untersucht. Dazu wurden A549-Zellen infiziert (4.4.45), zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und aufgeschlossen (4.2.5). Zum Nachweis der p53- und Mre11-Degradation wurden *Western Blot*-Analysen durchgeführt (4.7.4; Abb. 30).



**Abb. 29 Abbau von p53 und Mre11**

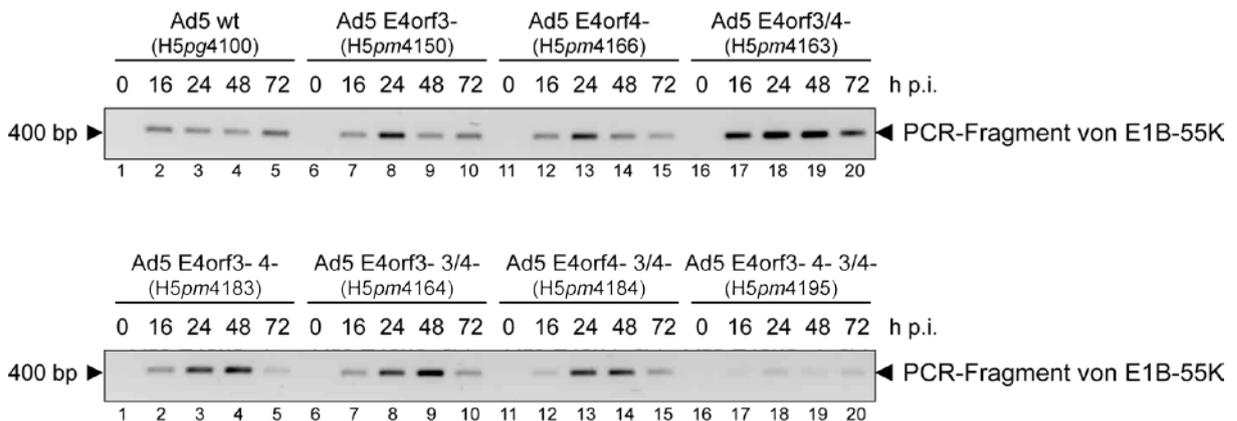
A549-Zellen wurden mit den verschiedenen Ad5 E4-Virusmutanten infiziert (moi 5 ffu/Zelle) (4.4.5) und zu den angegebenen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet (4.2.5). Der Zeitpunkt 0 bedeutet nicht infiziert (*mock*). Es wurden je 40 µg Gesamtzelleextrakt über 12%ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Der Nachweis erfolgte mit den Primärantikörpern  $\alpha$ -Mre11,  $\alpha$ -p53,  $\alpha$ - $\beta$ -Aktin und entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörpern (3.4).

Wie die Ergebnisse zeigen, sind alle Ad5 E4-Virusmutanten, die E1B-55K und E4orf6 exprimieren können (vgl. Abb. 27 und Abb. 28), fähig die zellulären Proteine p53 und Mre11 zu degradieren (Abb. 30). Konsistent dazu ist die Dreifach-Nullmutante Ad5 E4orf3- 4- 3/4- nicht mehr in der Lage (Abb. 30, unten). Dies ist vermutlich durch zu geringe bzw. nicht nachweisbare Mengen von E1B-55K und E4orf6 zu erklären, wodurch diese Mutante keinen funktionsfähigen E3-Ubiquitinligase-Komplex bilden kann und das Tumorsuppressorprotein p53 im zeitlichen Verlauf der Infektion akkumuliert. Mre11 kann ebenfalls nicht mehr durch diesen Komplex dem Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Abbau zugeführt werden und folglich bleiben die Mre11-Mengen im zeitlichen Verlauf der Infektion konstant.

#### 5.6.4 Analyse der DNA-Replikation

Im Folgenden wurde überprüft, ob die verschiedenen Mutationen in der E4-Region Auswirkungen auf die Initiation der viralen DNA-Replikation haben. Der Zeitpunkt des Einsetzens sowie der Verlauf der DNA-Replikation wurden durch ein modifiziertes PCR-Verfahren aus

virusinfizierten Zellen bestimmt. Dazu wurde die Zelllinie A549 mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (4.3.4), nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und aufgeschlossen (4.2.5). Die PCR-Reaktionen wurden wie unter 4.5.6 beschrieben durchgeführt. Die Reaktionsprodukte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert und mit Hilfe des *G:Box Systems* (Syngene) dokumentiert (Abb. 31).



**Abb. 31 Analyse der viralen DNA-Replikation**

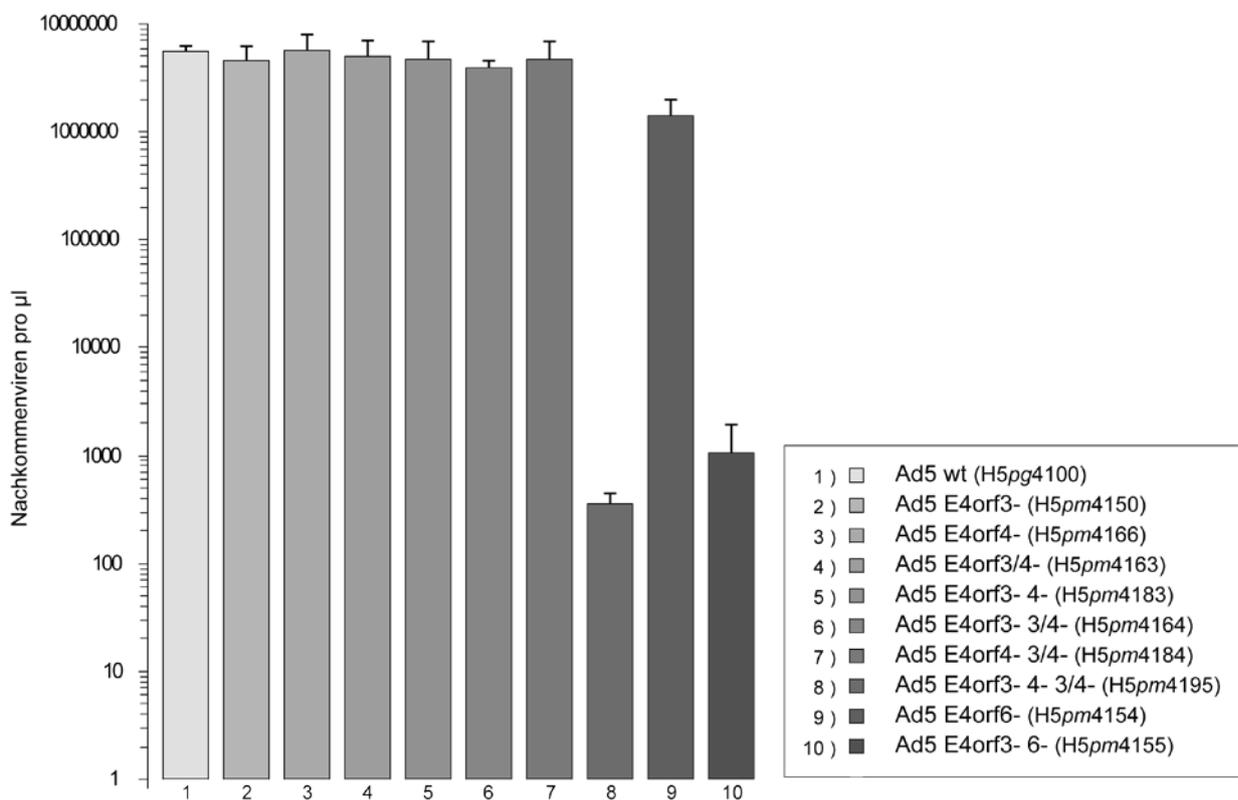
A549-Zellen wurden mit den verschiedenen E4-Virusmutanten infiziert (moi 5 ffu/Zelle) und zu den angegebenen Zeitpunkten (h p.i.) geerntet. Die virale DNA-Synthese wurde durch PCR wie unter 4.5.6 beschrieben bestimmt. Die amplifizierten E1B-PCR-Fragmente wurden auf einem Agarosegel analysiert und die Intensität der Banden in Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen mit dem *G:Box System* (Syngene) dokumentiert.

Die PCR-Analysen ergaben, dass sich die Effizienz der viralen DNA-Synthese bei den verschiedenen Virusmutanten deutlich unterscheidet. Bereits 16 h p.i. konnte bei allen Virusmutanten neu-synthetisierte virale DNA nachgewiesen werden, wobei die E4orf3/4-negative Mutante Ad5 E4orf3/4- deutlich stärkere Signale liefert (Abb. 31). Da die PCR-Fragmente bei den E4-Virusmutanten ein sehr heterogenes Muster zeigen, wurde vorerst auf eine semi-quantitative Bestimmung der DNA-Mengen verzichtet. Vergleicht man jedoch die PCR-Fragmentmuster untereinander fällt auf, dass die Mutanten Ad5 E4orf3- und Ad5 E4orf4- eine ähnliche DNA-Synthese aufweisen (Abb. 31, oben, Spuren 17 - 19). Analog zeigt sich dies auch bei den Ad5 E4-Doppel-Nullmutanten, die ebenfalls alle drei ein vergleichbares Bandenmuster zeigen (Abb. 31, unten). Des Weiteren fällt auf, dass Ad5 E4orf3/4- im Vergleich zu allen anderen hier untersuchten Viren offensichtlich deutlich höhere DNA-Mengen synthetisieren kann (Abb. 31, oben). Dies ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass E4orf3/4 eine negativ-regulatorische Funktion auf die virale DNA-Replikation ausübt. Wie die Ergebnisse ausserdem zeigen, ist die Virusmutante Ad5 E4orf3- 4- 3/4- stark defekt in ihrer DNA-Replikation

(Abb. 31, unten). Dagegen ist das PCR-Fragmentmuster für die DNA-Replikation des Ad5 wt (H5pg4100) konsistent zu bereits veröffentlichten Daten (Kindsmüller *et al.*, 2007).

### 5.6.5 Untersuchung der Produktion von Nachkommenviren

Abhängig vom verwendeten Zellsystem wird die Produktion von Nachkommenviren ähnlich wie die Synthese später Strukturproteine unterschiedlich stark vom E1B-55K-Protein beeinflusst. Daneben hängt die virale Reproduktion auch von der Expression von E4orf6 und eines funktionalen E3-Ubiquitinligase-Komplexes ab. A549-Zellen wurden mit den verschiedenen Ad5 E4-Virusmutanten infiziert (4.4.5) und wie unter 4.4.6 beschrieben die Ausbeute an Nachkommenviren bestimmt (Abb. 32).



**Abb. 32 Produktion von Nachkommenviren**

Um die Ausbeute an Nachkommenviren zu bestimmen wurden A549-Zellen mit den verschiedenen Ad5 E4-Virusmutanten infiziert (moi 5 ffu/Zelle) und 72 h p.i. geerntet. Aus den infizierten Zellen wurden die Nachkommenviren isoliert und anschließend auf W162-Zellen die Titer bestimmt (4.4.6). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Wie in der Grafik zu sehen ist, zeigt die Dreifach-Nullmutante Ad5 E4orf3- 4- 3/4- auch in der viralen Replikation einen stark defekten Phänotyp (Abb. 32, Spur 8). Im Gegensatz dazu, sind die Einfach- (Abb. 32, Spuren 2 - 4) und Doppel-Nullmutanten (Abb. 32, Spuren 5 - 7) in der Lage Nachkommenviren in ähnlichen Mengen wie der Ad5 wt (Abb. 32, Spur 1) zu generieren. Dieses Ergebnis ist zum Teil konsistent mit Beobachtungen in denen E4orf3- bzw. E4orf4-negative Virusmutanten im Vergleich zum Wildtyp keinen Replikationsdefekt zeigen (Shepard und Ornelles, 2003; Shepard und Ornelles, 2004; Miron *et al.*, 2009). Obwohl die Dreifach-Nullmutante auf der Zelllinie 2E2 vermehrt werden konnte, ist sie in A549-Zellen replikationsdefekt. Basierend auf der Zahl der infizierten Zellen, würde sich für Ad5 E4orf3- 4- 3/4- ein berechneter Wert von weniger als ein Nachkommenviruspartikel pro Zelle ergeben. Ergänzend wurden die beiden Virusmutanten Ad5 E4orf6- (H5pm4154) und Ad5 E4orf3- 6- (H5pm4155) für diese vergleichende Analyse verwendet (Abb. 32, Spuren 9 und 10). Wie bereits bekannt ist, besitzen E4orf6-negative Ad5-Mutanten sowie Ad5 E4orf3/E4orf6-Deletionsmutanten einen replikationsdefekten Phänotyp, da diese Viren unter anderem die zelluläre DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur nicht mehr effektiv inhibieren können und deren Genome zu unregelmäßigen Konkaternen ligiert werden (Weiden und Ginsberg, 1994; Boyer *et al.*, 1999; Stracker *et al.*, 2002).

## 5.7 Nachweis von E4orf3/4

Die Existenz des adenoviralen E4orf3/4-Proteins wird seit 26 Jahren kontrovers diskutiert (Herisse *et al.*, 1981; Freyer *et al.*, 1984; Dix und Leppard, 1993; Täuber und Dobner, 2001b), da eine Identifikation dieses Proteins bis heute fehlt. Gründe hierfür sind unter anderen der schwierige Nachweis der E4orf3/4-mRNA (Dix und Leppard, 1993), das Fehlen geeigneter Virusmutanten, die schlechte Verfügbarkeit von passenden Antikörpern sowie die kurze Halbwertszeit des E4orf3/4-Genprodukts. Um die Daten aus den vorangegangenen Experimenten besser interpretieren zu können wäre es wichtig E4orf3/4 als Protein zu identifizieren bzw. einen Nachweis für die Existenz dieses Fusionsproteins zu liefern.

### 5.7.1 Herstellung von FLAG-fusionierten Ad5 E4-Virusmutanten

Unter Berücksichtigung der kurzen Halbwertszeit von E4orf3/4 von nur ca. 14 min (Abb. 11, B) und der vermutlich sehr geringen Expressionsmengen von E4orf3/4 in virusinfi-

zierten Zellen, sind für einen Nachweis des Proteins fluoreszenzmikroskopische Analysen am besten geeignet. Derzeit gibt es jedoch keinen spezifischen Antikörper gegen das E4orf3/4-Protein. Mit dem E4orf4-spezifischen Antikörper  $\alpha$ -E4orf4 (2419) ist es zwar möglich in transient transfizierten Zellen stark überexprimiertes E4orf3/4 nachzuweisen, aufgrund vieler Hintergrundsignale sowie geringer Sensitivität ist dieser Antikörper jedoch für den Nachweis schwach exprimierter Proteine in *Western Blot*- und fluoreszenzlichtmikroskopischen Analysen nicht geeignet. Eine weit verbreitete Methode ist es, Proteine mit einem gut detektierbaren Epitop zu fusionieren. Um die E4-Region so wenig wie möglich zu verändern, wurde mit Hilfe des bereits ausführlich beschriebenen Klonierungssystems (5.3) die Nukleotidsequenz für das sogenannte FLAG-Epitop aminoterminal in den E4orf3-Leserahmen inseriert (Abb. 33). Die Insertion erfolgte zunächst auf einem E4-Box-Plasmid (3.3.4), ähnlich einer zielgerichteten Mutagenese. Diese E4-Box wurde anschließend in das adenovirale Restgenom ligiert und die so entstandenen Bacmide in eine Helferzelllinie transfiziert. Anschließend konnten daraus infektiöse, FLAG-Epitop tragende Viruspartikel isoliert und propagiert werden. Eine carboxyterminale Fusion des FLAG-Epitops mit E4orf4 konnte nicht generiert werden, da der E4orf4-Leserahmen mit E4orf6 überlappt (Abb. 23). Durch das Einfügen eines ATT-Codons nach dem Start-ATG für die FLAG-Sequenz wurde der E4orf2-Leserahmen nicht verändert.

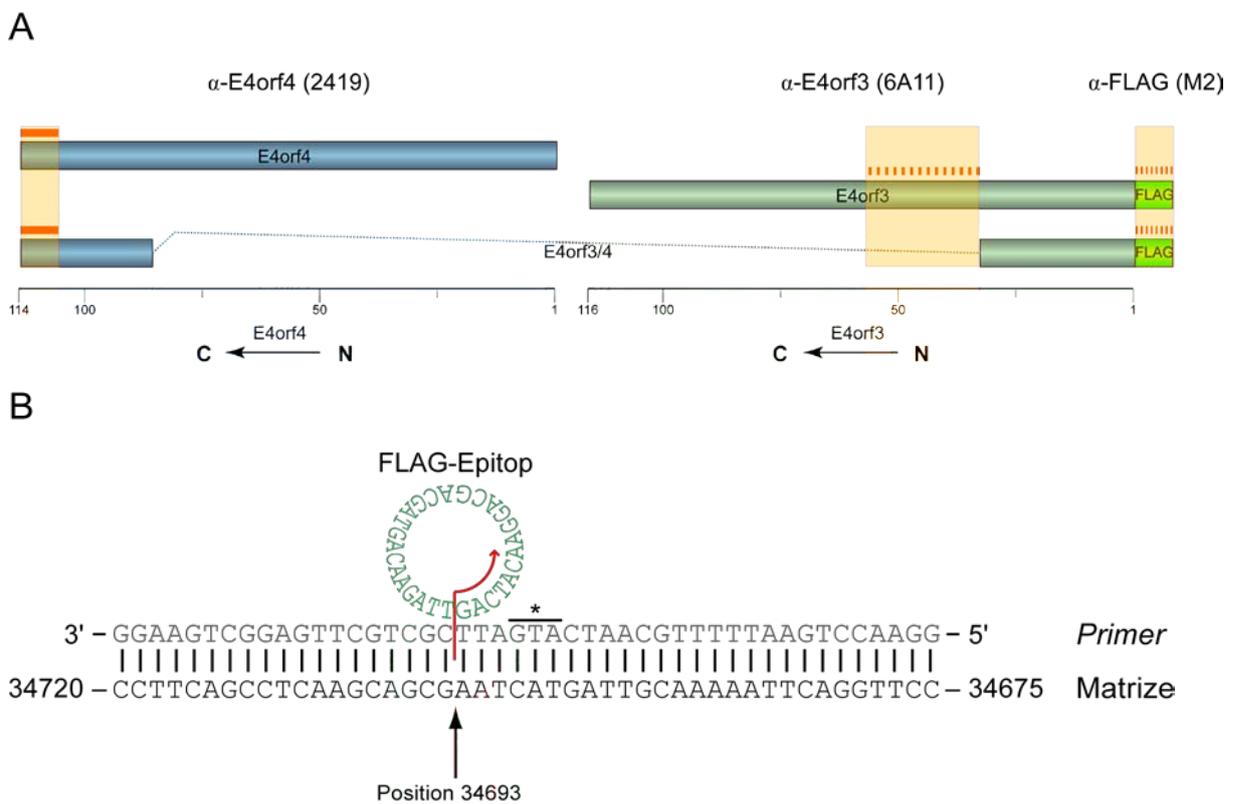


Abb. 33    Antikörper-Binderegionen und FLAG-loop in

(A) Graphische Darstellung der Antikörper-Binderegionen von  $\alpha$ -E4orf4 (2419),  $\alpha$ -E4orf3 (6A11) und  $\alpha$ -FLAG (M2). (B) Prinzip und Lage der FLAG-Insertion in den E4orf3-Leserahmen. Der schwarze Pfeil zeigt die Lage der insertierten FLAG-Sequenz mit der Position auf der Ad5-Bacmid-Sequenz an. Der rote Pfeil gibt die Orientierung der FLAG-Nukleotidsequenz an. Der Stern (\*) markiert das Startcodon des E4orf3-Leserahmens.

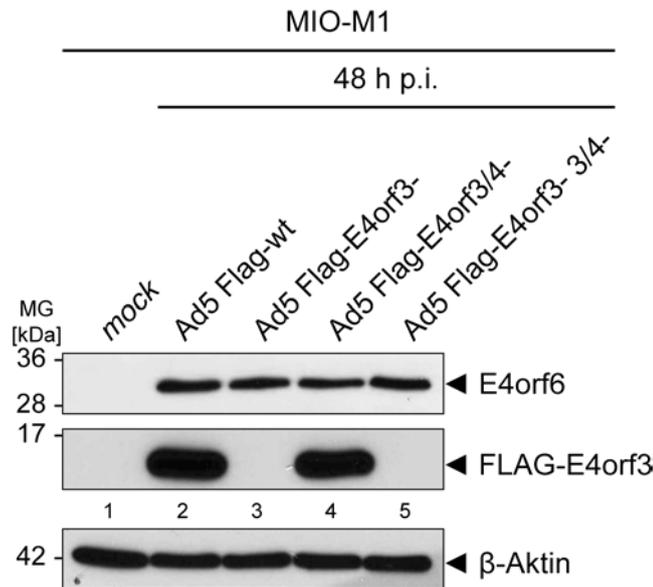
In der graphischen Darstellung der Antikörper-Binderegionen wird ersichtlich, dass der spezifische E4orf3-Antikörper  $\alpha$ -E4orf3 (6A11) nur das E4orf3-Volllängeprotein detektiert, während der Antikörper  $\alpha$ -Flag (M2) sowohl das E4orf3-Volllängeprotein als auch das E4orf3/4-Protein detektieren sollte (Abb. 33). Mit einer derart modifizierten Adenovirusmutante sollte es in vergleichenden fluoreszenzlichtmikroskopischen Analysen möglich sein, das E4orf3-Signal vom E4orf3/4-Signal eindeutig zu unterscheiden. In einer FLAG-modifizierten Ad5 E4orf3-Mutante sollten der E4orf3- und der FLAG-spezifische Antikörper für das E4orf3-Volllängeprotein kolokalisierende Signale liefern, während  $\alpha$ -Flag (M2) zusätzlich E4orf3/4 detektieren soll. Um sicher zu sein, dass das zusätzliche Signal tatsächlich von E4orf3/4 stammt, wurden zwei Kontrollmutanten (Ad5 FLAG-E4orf3 3/4<sup>-</sup>, Ad5 FLAG<sup>+</sup> E4orf3<sup>-</sup> 3/4<sup>-</sup>) generiert. Mit Ad5 FLAG-E4orf3 3/4<sup>-</sup> sollte bestätigt werden, dass beide Antikörpersignale für das E4orf3-Protein kolokalisieren und daher das System für einen fluoreszenzmikroskopischen Nachweis des E4orf3/4-Proteins geeignet ist. Zusätzlich sollte mit der Mutante Ad5 FLAG<sup>+</sup> E4orf3<sup>-</sup> 3/4<sup>-</sup> ausgeschlossen werden, dass durch die Insertion des FLAG-Epitops das Spleißmuster in der E4-Region so stark beeinflusst wird, dass als Folge unerwünschte FLAG-fusionierte Proteine generiert werden und Hintergrundsignale liefern. In Tabelle 4 sind alle neu generierten FLAG-tragenden Ad5 E4-Virusmutanten zusammengefasst.

**Tab. 4 Übersicht über die FLAG-modifizierten Ad5 E4-Mutanten**

Virus	Bezeichnung	Phänotyp			
		FLAG	E4orf3	E4orf3/4	E4orf4
H5pm4209	Ad5 FLAG-wt	+	+	+	+
H5pm4210	Ad5 FLAG-E4orf3/4 3 <sup>-</sup>	+	-	+	+
H5pm4211	Ad5 FLAG-E4orf3 3/4 <sup>-</sup>	+	+	-	+
H5pm4212	Ad5 FLAG <sup>+</sup> E4orf3 <sup>-</sup> 3/4 <sup>-</sup>	+	-	-	+

Die Ad5 E4-Mutanten wurden zunächst auf die Expression der FLAG-fusionierten Proteine in überprüft. Da manche Defekte von Virusmutanten in Tumorzelllinien nur schwer zu beobachten sind, wurden hierfür "pseudo-primäre" MIO-M1-Zellen mit den Flag-modifizierten Ad5-Mutanten infiziert. Um zusätzlich auszuschließen, dass die FLAG-Insertion zu einem Verlust

der *downstream* E4-Genprodukte führt, wurde die Expression von E4orf6 nachgewiesen.



**Abb. 34 Gleichgewichtsmengen von E4orf6 und FLAG-E4orf3**

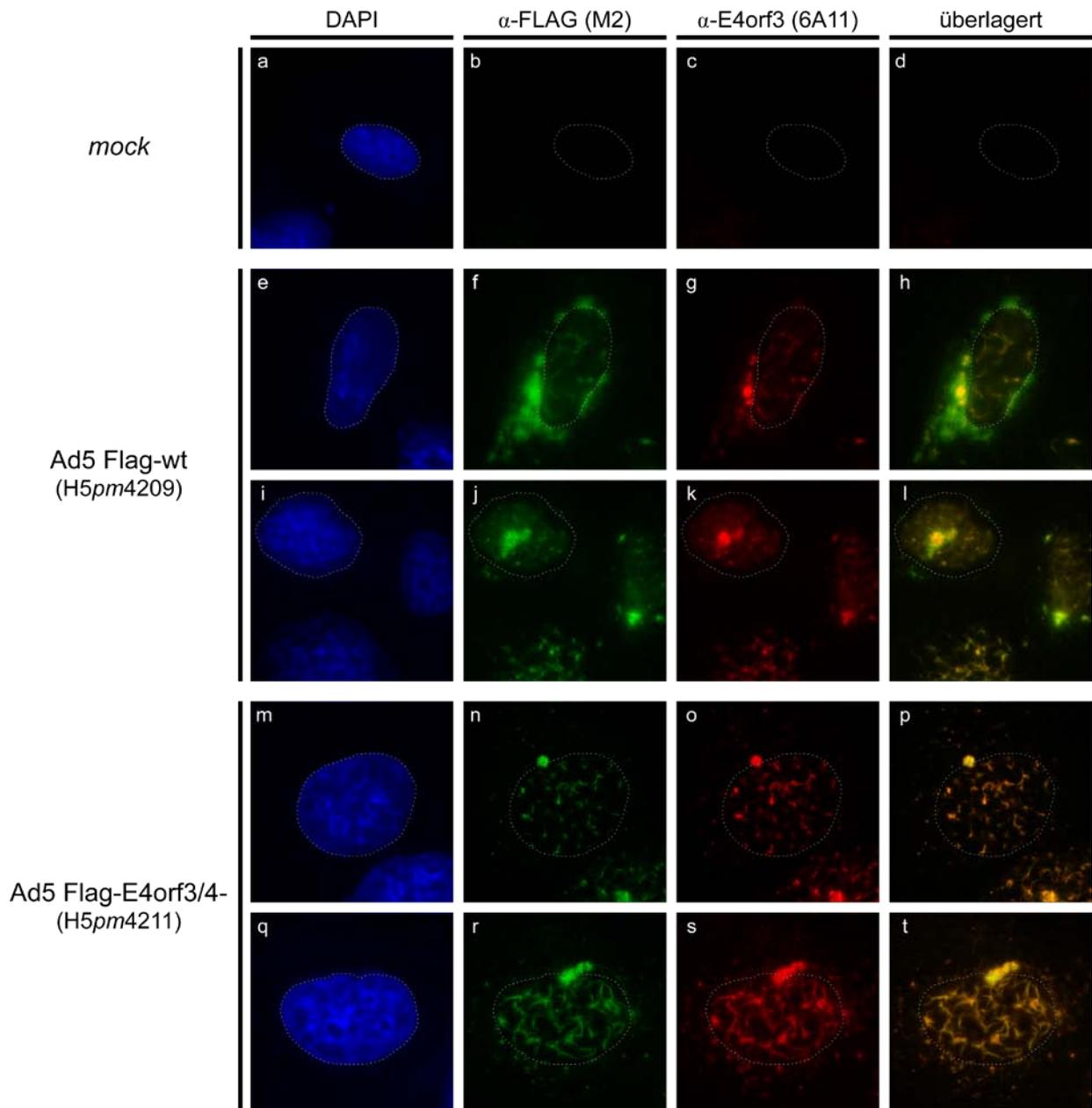
MIO-M1 Zellen wurden mit den FLAG-fusionierten Ad5 E4-Mutanten infiziert (4.4.5), 48 h p.i. geerntet (4.2.5) und Gesamtzelllysat hergestellt (4.7.1). Anschließend wurden 30 µg Proteinlysat in einem 15%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels *Western Blot* auf eine PVDF-Membran übertragen (4.7.4). Die Detektion der Proteine erfolgte mit den spezifischen Antikörpern  $\alpha$ -E4orf6 (RSA3),  $\alpha$ -FLAG (M2),  $\alpha$ - $\beta$ -Aktin (AC-15) sowie entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörpern (3.4).

Wie die Ergebnisse zeigen, sind die E4orf6-Mengen 48 h p.i. gleich stark exprimiert (Abb. 34, Spuren 2 - 5). Dies bedeutet, dass die Insertion der FLAG-Sequenz an den Aminoterminus von E4orf3 das Spleißmuster in der E4-Region anscheinend nicht zerstört bzw. sich nicht negativ auf die Expression *downstream* von E4orf3 kodierten E4-Genprodukten auswirkt. Des Weiteren ist zu erkennen, dass das FLAG-fusionierte E4orf3 in virusinfizierten Zellen exprimiert wird und der Antikörper  $\alpha$ -FLAG (M2) ein gutes Signal liefert (Abb. 34, Spuren 2, 4). Trotz der guten Signalstärke, die der FLAG-Antikörper liefert, war es in *Western Blot* Analysen nicht möglich, das E4orf3/4-Protein eindeutig nachzuweisen.

## 5.7.2 Fluoreszenzlichtmikroskopie

Eine Alternative zum immunhistochemischen Nachweis mittels *Western Blot* ist die Detektion von E4orf3/4 über die sensitivere Fluoreszenzlichtmikroskopie. Dabei ist es möglich, abhängig von der Fixierungsmethode, den Zustand bzw. die Situation innerhalb einer Zelle zu jedem Zeitpunkt im Infektionsverlauf zu fixieren. Dadurch können auch sehr kurzlebige und

schwach exprimierte Proteine detektiert werden. Für den bereits erläuterten fluoreszenzlichtmikroskopischen Nachweis des E4orf3/4-Proteins wurden "pseudoprimäre" humane Gliazellen (MIO-M1) mit den FLAG-fusionierten Ad5-Mutanten Ad5 FLAG-wt (H5pm4209) und Ad5 FLAG-E4orf3 3/4- (H5pm4211) infiziert und 24 h p.i. mittels eisgekühltem Methanol fixiert. Anschließend wurden die Proben mit den Antikörpern  $\alpha$ -Flag (M2) und  $\alpha$ -E4orf3 (6A11) inkubiert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert (4.7.6) (Abb. 35).



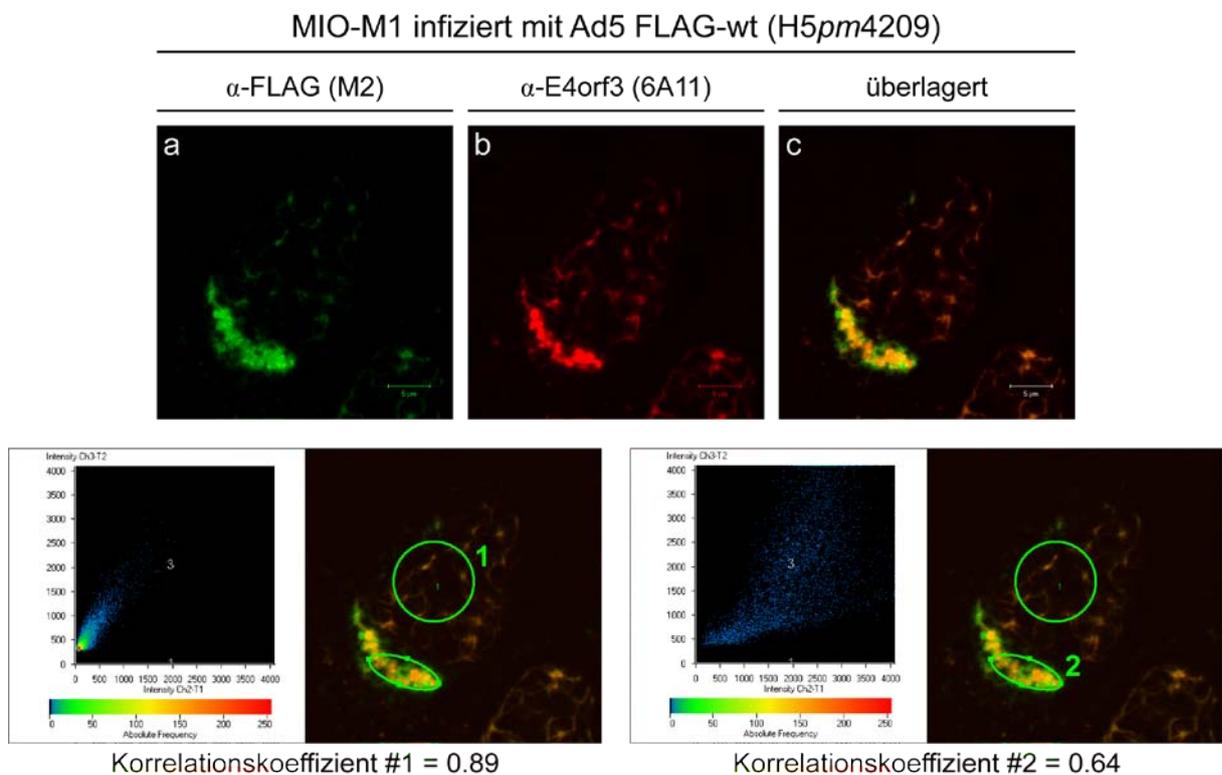
**Abb. 35 Fluoreszenzlichtmikroskopischer Nachweis des E4orf3/4-Proteins**  
MIO-M1 Zellen wurden mit den Ad5 FLAG-fusionierten Virusmutanten infiziert (4.4.5) und 24 h p.i. mit Methanol fixiert (4.7.6.1). Der immunologische Nachweis (4.7.6.2) der adenoviralen E4-Proteine

(E4orf3, E4orf3/4) erfolgte mit den spezifischen Antikörpern  $\alpha$ -E4orf3 (6A11) und  $\alpha$ -FLAG (M2) sowie entsprechenden Fluorochrom-markierten Sekundärantikörpern (3.4). Die Zellkerne sind mit DAPI sichtbar gemacht, sowie durch eine gestrichelte Linie angedeutet.

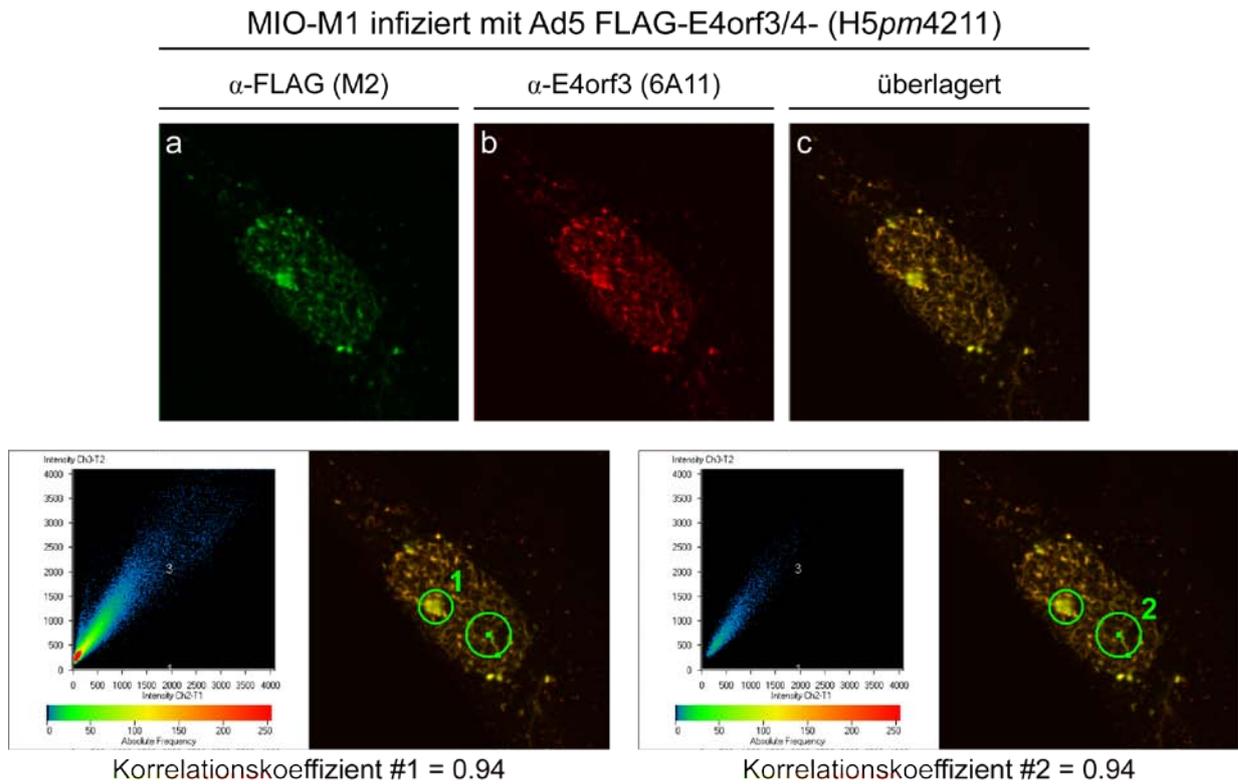
Wie erwartet lieferten die verwendeten Antikörper  $\alpha$ -Flag (M2) und  $\alpha$ -E4orf3 (6A11) keine unspezifischen Hintergrundsignale (Abb. 35; a - d). Dies ist eine der wichtigsten Voraussetzungen für diese vergleichenden Analysen. In Ad5 FLAG-wt infizierten Zellen zeigte der E4orf3-spezifische Antikörper  $\alpha$ -E4orf3 (6A11) die bekannte Lokalisation von E4orf3 in nukleären *tracks* sowie perinukleären Aggregaten (Abb. 35; g, k). Der FLAG-spezifische Antikörper  $\alpha$ -Flag (M2) detektierte im Vergleich dazu ein ähnliches Signal (Abb. 35; f, j). Jedoch fällt bei genauerer Betrachtung auf, dass die Signale welche der FLAG-Antikörper im Zytoplasma liefert größtenteils diffus sind, während  $\alpha$ -E4orf3 (6A11) überwiegend klare, teils globuläre Strukturen im Zellplasma detektiert (Abb. 35; g, k, l). Dies war eine erste entscheidende Beobachtung, denn die diffusen zytoplasmatischen Signale des FLAG-Antikörpers sind konsistent mit den Ergebnissen aus den Immunfluoreszenz-Analysen in transient transfizierten Zellen (Abb. 9; h), in denen gezeigt wurde, dass E4orf3/4 diffus im Zytoplasma lokalisiert. Die Unterschiede der beiden Antikörpersignale werden vor allem in der Kanalüberlagerung deutlich (Abb. 35; h, l). Hier erscheinen kolokalisierende Signale orange, während nicht-kolokalisierende entweder grün ( $\alpha$ -Flag) bzw. rot ( $\alpha$ -E4orf3) erscheinen. Daraus wird deutlich, dass für E4orf3 die Signale beider Antikörper sowohl bei den nukleären *tracks* als auch im perinukleären Aggregat kolokalisieren (Abb. 35; g, l). Im Vergleich dazu liefert erwartungsgemäß der Antikörper  $\alpha$ -Flag (M2) ein weiteres Signal das vermutlich E4orf3/4 darstellt (Abb. 35; g, l). Um diese Vermutung zu bestätigen und um auszuschließen, dass die insertierte FLAG-Sequenz durch ein verändertes Spleißen in der E4-Region zu FLAG-fusionierten *non-sense* bzw. *missense* Proteinen führt, wurden zusätzlich Ad5 Flag-E4orf3/4-infizierte Zellen analysiert. Wie die Ergebnisse zeigen, entsprechen die Signale des FLAG-spezifischen Antikörpers denen, des E4orf3-spezifischen Antikörpers (Abb. 35; p, t). Somit konnte hiermit indirekt bestätigt werden, dass es sich bei den diffusen zytoplasmatischen Signalen in Ad5 FLAG-wt-infizierten Zellen (Abb. 35, h, i) um das adenovirale Fusionsprotein E4orf3/4 handelt. Um optische Streu- und Überlagerungseffekte auszuschließen, wurden Ad5 FLAG-wt und Ad5 FLAG-E4orf3/4 infizierte Zellen mittels eines konfokalen Laser *Scanning* Mikroskops (Zeiss CLSM-510) analysiert (Abb. 36). Durch eine Software gestützte Analyse der Bildpunkte aus dem grünen und dem roten Kanal konnten die jeweiligen Signale einer frei gewählten Fläche "1" oder "2" erfasst werden und daraus ein sogenannter Pearson-

Korrelationskoeffizient (P-Wert) errechnet werden (Zinchuk und Zinchuk, 2008). Der sogenannte P-Wert, der zwischen +1 und -1 variieren kann, gibt dabei an, inwieweit zwischen Datenpunkten ein positiver (+1) bzw. negativer (-1) linearer Zusammenhang gegeben ist. Nähert sich der P-Wert gegen Null, bedeutet dies, dass keine lineare Korrelation zwischen den Datenpunkten besteht. Da beide Antikörper E4orf3 im aminoterminalen Bereich detektieren, ist für E4orf3 eine lineare Korrelation der Signale und ein P-Wert nahe +1 zu erwarten. Folglich sollte sich ein niedrigerer P-Wert ergeben, wenn E4orf3/4 exprimiert wird, da es von  $\alpha$ -FLAG (M2) nicht aber von  $\alpha$ -E4orf3 (6A11) detektiert werden sollte.

A



B



**Abb. 36 Laserkonfokalschnitte Ad5 FLAG-wt- und Ad5 FLAG-E4orf3/4-infizierter Zellen**

MIO-M1 Zellen wurden mit den Ad5 FLAG-fusionierten Virusmutanten infiziert (moi 10 ffu/Zelle; 4.4.5) und 24 h p.i. mit Methanol fixiert (4.7.6.1). Der immunologische Nachweis (4.7.6.2) der adenoviralen E4-Proteine E4orf3 und E4orf3/4 erfolgte mit den spezifischen Antikörpern  $\alpha$ -E4orf3 (6A11) und  $\alpha$ -FLAG (M2) sowie entsprechenden Fluorochrom-markierten Sekundärantikörpern (3.4). Anschließend wurden die Zellen mit einem Laserkonfokalmikroskop (Zeiss CLSM-510) analysiert und aus den Konfokalschnitten mittels der Software LCM-FCS Version 3.2 die Korrelationskoeffizienten errechnet. (A) Ad5 FLAG-wt-infizierte MIO-M1-Zellen. (B) Ad5 FLAG-E4orf3/4-infizierte MIO-M1-Zellen.

Wie die Laserkonfokalschnitte in der Überlagerung zeigen (Abb. 36), sind die Ergebnisse konsistent mit den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 35). Man kann beobachten, dass der FLAG-spezifische Antikörper  $\alpha$ -FLAG (M2) in Ad5 FLAG-wt infizierten Zellen neben E4orf3 im perinukleären Bereich zusätzliche Signale liefert (Abb. 36, A). Im Vergleich dazu kolokalisieren die nukleären Signale beider Antikörper  $\alpha$ -FLAG (M2) und  $\alpha$ -E4orf3 (6A11) zu 100% (Abb. 36, B). In den dazugehörigen Streudiagrammen (Abb. 36), in denen die Datenpunkte aus dem grünen und dem roten Kanal in einem Koordinatensystem aufgetragen sind, ergibt sich bei einer positiven linearen Korrelation ein Verteilungsmuster ähnlich einer Geraden (Abb. 36, B), während die Datenpunkte bei geringerer oder fehlender Korrelation stark streuen (Abb. 36, A unten rechts). In Ad5 FLAG-wt infizierten Zellen korrelieren im Zellkern die erfassten Bildpunkte des grünen Kanals mit denen des roten Kanals (Abb. 36, A

unten links), d. h. beide Antikörper erkennen hier erwartungsgemäß E4orf3. Der Wert des relativen Korrelationskoeffizienten beträgt hier 0.89. Im Gegensatz dazu unterscheidet sich das Bild des grünen Kanals deutlich von dem des roten Kanals im perinukleären Bereich (Abb. 36, A unten rechts). Folglich ergibt sich ein niedrigerer Wert von 0.64. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der Ad5 FLAG-E4orf3/4-infizierten Zellen, bei denen der P-Wert von 0.94 beträgt, wird ersichtlich dass sich die höhere Korrelation durch das Fehlen von E4orf3/4 erklärt. Somit konnte mittels Laserkonfokalmikroskopie der Nachweis der Expression von E4orf3/4 in virusinfizierten Zellen erbracht werden.

## 6 Diskussion

---

---

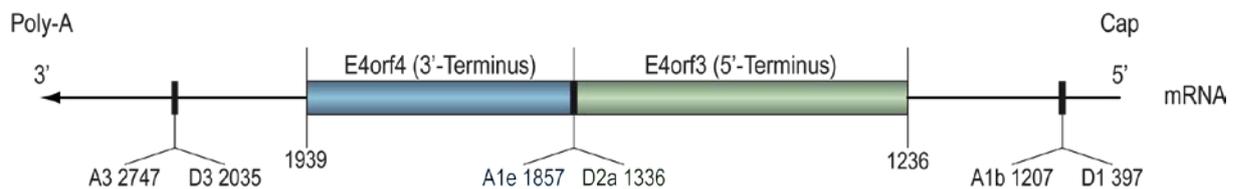
### 6.1 Die E4orf3/4-mRNA wird in humanen Ad5-infizierten Zellen synthetisiert

Definitionsgemäß wird der lytische Infektionszyklus von Adenoviren in eine frühe und eine späte Phase unterteilt, wobei die späte Phase mit dem Einsetzen der viralen DNA-Replikation beginnt. Die frühen Genprodukte, meist regulatorische Proteine, sollen dabei ein optimales Milieu für die Produktion von Nachkommenviren schaffen, während die späten Proteine hauptsächlich für die Assemblierung von Nachkommenviren benötigt werden (Horwitz, 1996). Fast alle adenoviralen Transkriptionseinheiten kodieren für mehrere Genprodukte, die durch alternatives Spleißen entstehen und nicht strikt getrennt nach früher bzw. später Phase der Infektion exprimiert werden (Flint, 1986). Im zeitlichen Verlauf der Infektion werden z. B. aus der L1-Transkriptionseinheit anfangs vermehrt längere mRNA-Spezies synthetisiert, während zu späteren Zeitpunkten der Infektion durch alternatives Spleißen kürzere mRNA-Transkripte entstehen (Akusjarvi und Persson, 1981; Leppard und Shenk, 1989).

Nach heutigem Wissensstand können in der E4-Region die mRNA-Transkripte auf ähnliche Weise unterschieden werden und es konnte für die E4-mRNAs im lytischen Infektionszyklus ebenfalls eine zeitliche Koordination im Spleißschema gezeigt werden (Dix und Leppard, 1993). Die frühen mRNA-Spezies wurden dabei erstmals fünf Stunden nach der Infektion detektiert und akkumulieren bis 9 h p.i. Im weiteren Verlauf blieben die Konzentrationen konstant oder nahmen geringfügig ab, während die späten mRNAs dagegen erst 9 h p.i. nachgewiesen werden konnten. Diese beiden mRNA-Klassen können anhand eines charakteristischen Introns zwischen der Spleißdonorstelle D3 und der -akzeptorstelle A3 voneinander unterschieden werden (Abb. 23). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die späten E4-mRNA-Spezies erst nach Einsetzen der viralen DNA-Replikation im Zytoplasma akkumulieren (Dix und Leppard, 1993).

Wie die Ergebnisse der mRNA-Analysen dieser Arbeit zeigen, wurden neben der E4orf3/4-mRNA auch die frühe und späte Spezies der E4orf3-mRNA sowie das E4orf6/7-Transkript nachgewiesen (Abb. 25). Konsistent zu den veröffentlichten Daten konnte das frühe E4orf3-Transkript in den hier durchgeführten Experimenten bereits 6 h p.i. detektiert werden, wobei

es zunächst bis 16 h p.i. akkumulierte, während die Konzentration im weiteren Verlauf der Infektion wieder geringer wurde (Abb. 25). Zusätzlich wurde die mRNA von E4orf6/7 erst 16 h p.i. detektiert und markiert in etwa den Zeitpunkt, an dem die virale DNA-Replikation unter den gewählten Versuchsbedingungen einsetzt. Im Gegensatz dazu konnte das späte E4orf3-mRNA-Transkript bereits 6 h p.i. schwach und 16 h p.i. deutlich detektiert werden und stellt somit eine zeitliche Zwischenklasse dar. Im Unterschied zu den von Dix und Leppard veröffentlichten Daten (Dix und Leppard, 1993), konnte in dieser Arbeit die mRNA von E4orf3/4 in Ad5-infizierten Zellen nachgewiesen (Abb. 25, A) und mittels der eigens dazu generierten Ad5 E4orf3/4-Nullmutante (H5pm4163) eindeutig identifiziert werden (Abb. 25, B). Das E4orf3/4-mRNA-Transkript konnte unter den gewählten Versuchsbedingungen erstmals 16 h p.i. detektiert werden und scheint im weiteren Verlauf der Infektion langsam zu akkumulieren (Abb. 25, A). Basierend darauf kann dieses mRNA-Transkript den späten E4-mRNA-Spezies zugeteilt werden. Durch eine Sequenzanalyse konnte die E4orf3/4-mRNA Struktur bestätigt werden. Dabei zeigte sich, dass das E4orf3/4-Transkript in Ad5 analog zu der in Ad2 identifizierten E4orf3/4-mRNA gespleißt wird (Abb. 37; Freyer *et al.*, 1984; Virtanen *et al.*, 1984).



**Abb. 37 E4orf3/4 mRNA-Struktur**

Graphische Darstellung der E4orf3/4 mRNA-Struktur mit Angabe der Positionen der Spleißdonorstellen (D) und -akzeptorstellen (A) in der Ad5 Nukleotidsequenz.

Gleichzeitig konnte mit der in dieser Arbeit angewandten Technik gezeigt werden, dass das E4orf3/4-Transkript in ähnlicher Stärke wie die E4orf6/7-mRNA synthetisiert wird (Abb. 25, A). Diese Aussage trifft jedoch nur für die in dieser Arbeit gezeigten Daten zu, da die mRNA-Analysen mit Hilfe einer Kombination aus reverser Transkription und anschließender PCR durchgeführt wurden. Mittels PCR ist es möglich auch geringste mRNA- bzw. DNA-Spuren nahezu beliebig zu verstärken. Dadurch ist hier lediglich eine halbquantitative Aussage über die mRNA-Mengen innerhalb der einzelnen Versuche möglich. Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit angewandten Technik wurden die verschiedenen E4-mRNA-Spezies früher über einen quantitativen RNase-Schutz-Assay mit radioaktiv markierten RNA-

---

---

Sonden durchgeführt (Dix und Leppard, 1993). Möglicherweise waren die damals verwendeten RNA-Sonden für einen Nachweis der E4orf3/4-mRNA nicht optimal gewählt. In der unterschiedlichen Sensitivität der beiden Techniken könnte auch die Erklärung liegen, warum in dieser Arbeit die mRNA von E4orf3/4 nachgewiesen werden konnte, während diese in einer früheren Veröffentlichung nicht detektiert werden konnte (Dix und Leppard, 1993). Beide Ergebnisse legen jedoch die Vermutung nahe, dass die E4orf3/4-mRNA in sehr geringen Mengen synthetisiert wird (Virtanen *et al.*, 1984).

Durch die Kombination eines fraktionierten Zellaufschlusses, reverser Transkription und nachfolgender PCR konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die E4orf3/4-mRNA effektiv ins Zytoplasma exportiert wird (Abb. 26), was eine wichtige Voraussetzung für die Expression des E4orf3/4-Proteins darstellt.

## 6.2 E4orf3/4 zeigt eine streng zytoplasmatische Lokalisation

Die Existenz des adenoviralen E4-Fusionsproteins E4orf3/4 wird bislang kontrovers diskutiert (Herisse *et al.*, 1981; Freyer *et al.*, 1984; Virtanen *et al.*, 1984; Dix und Leppard, 1993; Täuber und Dobner, 2001b). Ein Grund hierfür ist der fehlende Nachweis von E4orf3/4 auf Proteinebene und die schwierige Identifikation der E4orf3/4-mRNA in Ad5-infizierten Zellen (6.1).

Da über die Expression von E4orf3/4 und dessen subzelluläre Lokalisation bisher keine Daten veröffentlicht sind, wurden zu Beginn dieser Arbeit Transfektionsexperimente durchgeführt um aufzuklären, ob aufgrund der veröffentlichten cDNA-Sequenz dieses Ad5-Genprodukt nachgewiesen werden kann und wie dieses in der Zelle lokalisiert. Das Fusionsprotein E4orf3/4 setzt sich aus den 33 N-terminalen Aminosäuren von E4orf3 sowie den 28 carboxy-terminalen Aminosäuren von E4orf4 zusammen (Abb. 6) und daher wäre es vorstellbar, dass es ähnlich wie eines der beiden Volllänge E4-Proteine lokalisiert. Am Aminoterminus von Ad5 E4orf3 und E4orf3/4 befinden sich mehrere Leucin-Reste und hydrophobe Aminosäuren, die aufgrund ihrer Anordnung der Konsensus-Sequenz eines nukleären Exportsignals (NES) vom HIV1-Rev Typ  $L X_n (F/I/L/V/M) X_n L X (I/L)$  ( $n = 2$  bis  $3$ ) entsprechen (Bogerd *et al.*, 1996; Henderson und Eleftheriou, 2000). Proteine die ein NES-Motiv aufweisen, sind in der Lage mit zellulären Exportproteinen (z. B. Crm1) zu interagieren und dadurch den mRNA-Transport oder die eigene Translokation ins Zytoplasma zu vermitteln (Bray *et al.*, 1994; Fischer *et al.*, 1994; Pollard und Malim, 1998).

---

---

Des Weiteren befinden sich am C-Terminus von E4orf4 Aminosäuren (Pos. 80 - 95) durch die das Protein im Zellkern zurückgehalten werden kann (Miron *et al.*, 2004) und die zum Teil auch noch in E4orf3/4 enthalten sind. Während E4orf3 und E4orf4 beide eine Kernlokalisation zeigen (Abb. 9; b, e), erscheint in transient transfizierten Zellen E4orf3/4 anders als erwartet diffus im Zytoplasma verteilt (Abb. 9; h). Dies bedeutet, dass die C-terminalen Aminosäuren offenbar nicht in der Lage sind das Fusionsprotein im Zellkern zurückzuhalten. Im Gegensatz zu E4orf3, das im Zellkern lange fibrillöse Strukturen, sogenannte *tracks* bildet (Carvalho *et al.*, 1995), ist E4orf3/4 diffus und streng zytoplasmatisch verteilt. Dies kann möglicherweise durch einen aktiven CRM1/NES-abhängigen Export von E4orf3/4 aus dem Zellkern erklärt werden. Aufgrund seiner geringen Größe von nur 61 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 7,2 kDa wäre es vorstellbar, dass E4orf3/4 passiv aus dem Zytoplasma in den Zellkern diffundiert und anschließend über CRM1 aus dem Zellkern exportiert wird (Silver, 1991; Gorlich, 1997; Stryer, 1999). Experimente mit dem CRM1-spezifischen Inhibitor Leptomycin B (LMB) lieferten jedoch kein befriedigendes Ergebnis (Daten nicht gezeigt), so dass die Funktion des NES-Motivs in weiterführenden Untersuchungen analysiert werden sollte.

### 6.3 E4orf3/4 hat eine kurze Halbwertszeit

Die Ergebnisse der Transfektionsexperimente ergaben, dass es durchaus möglich ist, aufgrund der cDNA-Sequenz von E4orf3/4 ein exprimierbares Protein in Immunfluoreszenz- und *Western Blot*-Analysen nachzuweisen (5.1.1; 5.1.2). Dies erklärt jedoch nicht, warum bislang in virusinfizierten Zellen das E4orf3/4-Protein nicht nachgewiesen werden konnte, obwohl dessen mRNA synthetisiert und ins Zytoplasma exportiert wird (5.6.1). Vergleicht man die E4orf3/4-mRNA-Mengen mit denen von E4orf6/7 (Abb. 25), erkennt man, dass die Bandenmuster in etwa identische Signalstärken besitzen. E4orf6/7 wurde auf Proteinebene identifiziert und konnte in virusinfizierten Zellen nachgewiesen werden (Helin und Harlow, 1994; Boivin *et al.*, 1999). Aufgrund dieser Tatsachen, war es sehr wichtig in weiteren Transfektionsexperimenten die Halbwertszeit von E4orf3/4 zu bestimmen (Abb. 11).

Für die Bestimmung der Halbwertszeit von E4orf3/4, wurden Zellen transfiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten mit Cycloheximid behandelt (5.1.3). Cycloheximid ist ein Antibiotikum das von *Streptomyces griseus* synthetisiert wird und bei Eukaryoten als Translationshemmer wirkt. Dabei zeigte sich, dass E4orf3/4 eine Halbwertszeit von nur etwa 14 min besitzt (Abb. 11). Dieses Ergebnis könnte mit einer möglichen regulatorischen Funktion von E4orf3/4

---

---

in Verbindung gebracht werden. Regulatorische Proteine steuern natürliche Prozesse und Kreisläufe, wie Biosynthesewege, Zellwachstum und Zelldifferenzierung. Deren Expression und Halbwertszeit wird in der Zelle streng geregelt und kontrolliert um diverse Funktionen in den Zellen bei Bedarf an- bzw. abzuschalten (Stryer, 1999).

## 6.4 Transformationsförderndes Potenzial von E4orf3/4

Die vollständige Transformation primärer Zellen durch humane Adenoviren ist nach heutigem Wissen ein mehrstufiger Prozess, der durch das kooperative Zusammenwirken der E1A-, E1B- und E4-Genprodukte gesteuert wird. Genetische und epigenetische Veränderungen werden als weitere Faktoren diskutiert, die infolge der viralen DNA-Integration auftreten (Dörfler, 1996). Nach einem einfachen Modell leiten die E1A-Proteine die Immortalisierung primärer Zellen ein, während die E1B-Genprodukte für die Progression und Aufrechterhaltung des vollständig transformierten Phänotyps notwendig sind (Williams *et al.*, 1995). In Adenovirus-transformierten Zellen liegt die virale DNA vollständig oder nur teilweise im Wirtsgenom integriert vor, wobei alle onkogen transformierten Zellen konsistent das linke Ende des viralen Genoms mit den E1A/E1B-Regionen enthalten (Abb. 3). Ebenso können in den meisten transformierten Zelllinien, die nach Transfektion rekombinanter Plasmide etabliert wurden, die E1A- und E1B-Onkogene in integrierter Form nachgewiesen werden. Eine etablierte wissenschaftliche Meinung ist es daher, dass in Adenovirus- und Plasmid-transformierten Zellen die E1A- und E1B-Gene stabil integriert sein müssen (Graham, 1984). Obwohl die E1A- und E1B-Genprodukte für eine onkogene Transformation primärer Zellen in Kultur ausreichen, wurde lange vermutet, dass auch Genprodukte der E4-Region an der virusvermittelten Onkogenese beteiligt sind (Bernards *et al.*, 1984; Graham, 1984; Zalmanzon, 1987; Javier *et al.*, 1992). Erste Hinweise für eine Beteiligung der E4-Region an Transformationsvorgängen stammen von Analysen viraler Transkripte in virustransformierten Zellen (Flint *et al.*, 1975; Flint *et al.*, 1976; Flint und Sharp, 1976; Esche *et al.*, 1979; Esche, 1982) sowie dem Nachweis E4-spezifischer Antikörper in Tumorseren aus Hamstern (Brackmann *et al.*, 1980; Sarnow *et al.*, 1982a; Downey *et al.*, 1983). Weitere Studien zeigten, dass eine gemeinsame Expression der E4-Region oder einzelner Genprodukte mit E1A/E1B in etablierten Rattenzelllinien, zu einer stärkeren Ausbildung von Merkmalen onkogen transformierter Zellen führt (Shiroki *et al.*, 1984; Öhman *et al.*, 1995). Bereits 1984 konnte für Ad12 E1/E4-transformierte Zellen eine erhöhte Tumorigenität im Nacktmausmodell nachgewiesen werden (Shiroki *et al.*, 1984). Für

---

---

Ad5 E4orf3 und E4orf6 konnten transformierende Eigenschaften bestätigt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass E4orf3 und E4orf6 Funktionen von Ad5 E1B-55K bei der Initiation des Transformationsprozesses in Kombination mit E1A teilweise ersetzen können. Im Kontext von E1A zusammen mit E1B führen sie zur vollständigen Transformation primärer Zellen (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1999a; Nevels *et al.*, 1999b). Neben der Beteiligung von E4orf3 und E4orf6 am klassischen Mechanismus der Transformation sind beide in der Lage zusammen mit E1A Zellen nach einem "Hit & Run"-Mechanismus zu transformieren (Nevels *et al.*, 2001). Dabei wurde postuliert, dass die transiente Expression und/oder Integration bestimmter viraler Gene ausreicht, um Mutationen zu induzieren ("Hit"), die wiederum zur zellulären Transformation führen. Für die Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps auf genetischer Ebene sind die viralen Sequenzen nicht mehr notwendig und gehen im Verlauf mehrerer Zellteilungen verloren ("Run"). Über die molekularen Grundlagen der E1A/E4-vermittelten "Hit & Run"-Transformation ist derzeit nichts bekannt. Eine mögliche Erklärung liefert die Tatsache, dass beide E4-Proteine mutagene Eigenschaften besitzen (Nevels *et al.*, 2001). Die Akkumulation von Mutationen wird wahrscheinlich durch das Zusammenwirken mehrerer Faktoren ausgelöst, die sowohl die Induktion der zellulären DNA-Synthese durch E1A, als auch die Modulation zellulärer Regulatoren der Genexpression, Apoptose und DNA-Reparatur durch E4orf3 und E4orf6 umfassen. Des Weiteren wurde für beide E4-Proteine eine Bindung an die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK), einem Schlüsselenzym in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen nachgewiesen (Boyer *et al.*, 1999). Dazu wird diskutiert, dass die Wechselwirkung mit DNA-PK der Entstehung konkatermerer viraler Genome in lytisch infizierten Zellen entgegenwirkt (Weiden und Ginsberg, 1994; Boyer *et al.*, 1999; Nicolás *et al.*, 2000). Die Modulation von DNA-PK und die damit verbundene Inhibition der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur könnten zur genetischen Instabilität beitragen (Boyer *et al.*, 1999; Nicolás *et al.*, 2000).

Während E4orf3 in Kombination mit E1A zur "Hit & Run"-Transformation beiträgt, wird das E4-Genprodukt in Verbindung mit E1A und E1B in transformierten Zellen stabil exprimiert (Moore *et al.*, 1996; Nevels, 1999; Nevels *et al.*, 1999a). Konsistent dazu belegen Studien, dass in Adenovirus-transformierten Zellen gelegentlich E4-spezifische mRNAs existieren, die aber immer in Verbindung mit E1A und E1B, nie aber mit E1A alleine nachgewiesen wurden (Flint *et al.*, 1975; Flint *et al.*, 1976; Flint und Sharp, 1976; Esche *et al.*, 1979; Esche, 1982; Esche und Siegman, 1982). Interessanterweise zeigen die aus den Transformationsversuchen mit E1A/E1B und E4orf3 etablierten Zelllinien gegenüber E1A/E1B- und "Hit & Run"-transfor-

---

---

mierten Zellklonen deutliche Unterschiede in Bezug auf verschiedene *in vitro*-Merkmale onkogen transformierter Zellen (Nevels *et al.*, 1999b). Außerdem weisen diese Zellen eine erhöhte Tumorigenität und ein drastisch gesteigertes Tumorwachstum in Nacktmäusen auf (Nevels *et al.*, 1999a; Nevels *et al.*, 1999b). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die E1B-Genprodukte mutagene Aktivitäten von E4orf3 stabilisieren und, dass E4orf3 zusammen mit den E1A- und E1B-Genprodukten, die vollständige, maligne Transformation primärer Zellen induziert. Die molekularen Grundlagen des onkogenen Potenzials von E4orf3 sind derzeit noch unklar. Im Unterschied zu E4orf6 scheint E4orf3 die Stabilität von p53 nicht zu beeinflussen (Nevels *et al.*, 1999b).

Um eine mögliche biologische Funktion von E4orf3/4 und eine Beteiligung am E1A/E1B-55K-vermittelten Transformationsprozess aufzuklären, wurden in dieser Arbeit Transformations-*Assays* durchgeführt (5.2).

In den klassischen Transformations-*Assays* mit Plasmid-transfizierten pBRK-Zellen zeigte sich, dass E4orf3/4 zusammen mit E1A und E1B-55K ein starkes *Focus*-stimulierendes Potenzial besitzt. In diesen *Assays* findet eine Selektion auf lebende Zellen statt, während nicht-transformierte Zellen aufgrund von Seneszenz absterben. Daraus kann gefolgert werden, dass E4orf3/4 vermutlich nicht die zelltötenden Eigenschaften von E4orf4 besitzt (Marcellus *et al.*, 1998; Kleinberger, 2000; Branton und Roopchand, 2001). Konsistent zu bereits früher veröffentlichten Daten konnte in diesen Transformations-*Assays* eine gesteigerte *Focus*-Bildung in E1A/E1B-55K/E4orf3-transformierten Zellen beobachtet werden (Abb. 12). Im Vergleich dazu wurde die Anzahl der *Foci* in E1A/E1B-55K/E4orf3/4-transformierten Zellen um das 1,5-fache übertroffen, während die Anzahl der *Foci* in E1A/E1B-55K-transformierten Zellen sogar um das Vierfache überschritten wurde (5.2; Abb 12). Wie aus Vorversuchen hervor ging, besitzt E4orf3/4 allein oder zusammen mit E1A kein *Focus*-stimulierendes Potenzial (Daten nicht gezeigt). Dies könnte bedeuten, dass ähnlich wie in E1A/E1B-55K/E4orf3-transformierten Zellen E4orf3/4 stabilisiert wird oder mit E1B-55K im E1A-positiven Kontext kooperiert und dadurch *Focus*-stimulierende Funktionen ausüben kann. Des Weiteren wäre denkbar, dass der in E4orf3/4 enthaltene N-Terminus von E4orf3/4 ähnlich wie in E4orf3 wirkt. Für E4orf3 wurde in diesem Zusammenhang eine Wechselwirkung mit dem zellulären Transkriptionskoaktivator p300 diskutiert (Lucas, 2005). Als eine Folge dieser Wechselwirkung könnte möglicherweise eine Azetylierung des Tumorsuppressors p53 unterbunden werden. Dadurch können wichtige p53-Funktionen, wie die Einleitung von Apoptose und Zellzyklusarrest als Reaktion auf DNA-Schäden und andere externe Stimuli nicht mehr ausgeübt werden. Eine

---

---

Konsequenz dieser E4orf3-Wirkung ist schließlich die weitere Anhäufung von Mutationen und eine verstärkte *Focus*-Bildung (Lucas, 2005). Durch die Eigenschaften des E4orf4-Carboxyterminus könnten zusätzlich die Funktionen des Aminoterminus von E4orf3/4 verstärkt werden. Vorstellbar wäre in diesem Zusammenhang, dass C-terminale Aminosäuren eine Interaktion mit der Protein-Phosphatase 2A (PP2A) eingehen könnten und auf diese Weise E4orf3/4 deren Substratspezifität beeinflusst (Marcellus *et al.*, 2000; Shtrichman *et al.*, 2000).

In den Transformations-*Assays* mit infektiösen lentiviralen Partikeln konnte für E4orf3/4 ebenfalls ein *Focus*-stimulierendes Potenzial beobachtet werden. Im Unterschied zu den klassischen Transfektions-basierten *Assays*, war die Anzahl der gebildeten *Foci* geringer (Abb. 12; 13). Trotzdem zeigte sich auch hier, dass E4orf3/4 im Vergleich zu E4orf3 ein gesteigertes transformierendes Potenzial im E1A/E1B-55K-positiven Kontext besitzt (Abb. 13). Die insgesamt geringere Zahl von *Foci* ist vermutlich auf generelle Unterschiede zwischen den lentiviralen und klassischen Transformations-*Assays* zurückzuführen. So werden bei klassischen Transformations-*Assays* Expressionsplasmide transfiziert, wodurch die Mengen tatsächlich in die Zelle aufgenommener und integrierter viraler DNA-Sequenzen starken Schwankungen unterliegen. Im Vergleich dazu können aufgrund der LTR-Sequenzen (*long terminal repeat*) die adenoviralen cDNAs in den lentiviralen Partikeln effizienter ins Wirtszellgenom integrieren. Des Weiteren können die Titer der lentiviralen Partikel mittels Durchflusszytometrie exakt ermittelt werden, wodurch eine genauere Dosierung der eingesetzten Konstrukte ermöglicht wird. Zusammenfassend kann an dieser Stelle festgestellt werden, dass egal welches System für die Transformationsanalysen verwendet worden ist, E4orf3/4 bei gleichzeitiger Anwesenheit von E1A und E1B-55K in nicht-permissiven pBRK-Zellen ein starkes *Focus*-stimulierendes Potenzial besitzt, welches sogar das von E4orf3 übertrifft. Ob E1A/E1B-55K/E4orf3/4-transformierte Zellen auch ein tumorigenes Potenzial, wie E1A/E1B-55K/E4orf6-transformierte Zellen (Nevels *et al.*, 1999a; Nevels *et al.*, 1999b) besitzen, müsste in Nacktmausversuchen weiter untersucht werden.

Trotz ihrer transformierenden Eigenschaften in Nagetieren und in Gewebekultur konnten Adenoviren bislang nie überzeugend mit der Entstehung von malignen Erkrankungen des Menschen in Verbindung gebracht werden, da nur in wenigen Einzelfällen adenovirale DNA in Tumoren nachgewiesen werden konnte (Maitland *et al.*, 1981; Ibelgaufts *et al.*, 1982; Graham, 1984; Lawler *et al.*, 1994; Kuwano *et al.*, 1997a; Kuwano *et al.*, 1997b; Shenk, 2001; Kosulin *et al.*, 2007). Die Fähigkeit der E1- und E4-Gene zur "Hit & Run"-Transformation impliziert jedoch, dass Adenoviren möglicherweise in die Tumorgenese eingreifen können, ohne

---

---

dass die viralen Gene in den transformierten Zellen persistieren. Dadurch wäre der Nachweis eines Kausalzusammenhangs zwischen Adenovirus-Infektion und Tumorentstehung nahezu unmöglich.

Auf Grundlage der transformationssteigernden Eigenschaften von E4orf3/4, wäre für die Entwicklung von onkolytischen Adenoviren für die Anwendung in einer anti-Krebs Virotherapie zu überlegen, den Leserahmen für dieses E4-Proteine durch einen genetischen *knockout* wie in dieser Arbeit gezeigt (5.5), abzuschalten um das Risiko für eine Therapie-induzierte Tumorerkrankung zu senken. Immerhin scheint es, dass E4orf3/4 in Tumorzelllinien wie A549 keine essentielle Funktion für die Ad5-Virusreplikation spielt (5.6.5) und dadurch für Therapie-zwecke vernachlässigbar ist. Im Gegensatz dazu könnte E4orf3/4 als Teil einer Kombination aus antitumoraler Genterapie und Strahlentherapie verwendet werden um DNA-Reparaturmechanismen in Krebszellen zu inhibieren und diese für die Strahlentherapie zu sensibilisieren. Derzeit werden für eine Anwendung in diesem Therapieansatz die adenoviralen Proteine E1B-55K, E4orf6 und E4orf3 in Kombination mit ionisierender Strahlung diskutiert um durch deren Wechselwirkungen mit DNA-PK, Mre11 und p53 Tumorzellen für die Strahlentherapie zu sensibilisieren (Collis *et al.*, 2003; Lupold und Rodriguez, 2005).

## 6.5 Interaktion von PCNA mit E4orf3/4

Für die Identifikation zellulärer Proteine, die mit E4orf3/4 in Wechselwirkung treten können, wurde im Hefe-Zwei-Hybridsystem mit Hilfe einer cDNA-Bibliothek aus B-Zellen eine Interaktionssuche durchgeführt (4.3). Dabei konnte unter anderem PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) als Interaktor von E4orf3/4 identifiziert werden (5.3). PCNA ist ein nukleäres Protein das als Homotrimer an diversen Prozessen in der Zelle beteiligt ist. PCNA dient unter anderem als Ringklemme und Kofaktor für zelluläre DNA-Polymerasen und ist dadurch an der DNA-Replikation sowie DNA-Reparaturmechanismen beteiligt (Moldovan *et al.*, 2007). Über zahlreiche Interaktionen mit Proteinen die ein sogenanntes PIP-Box-Motiv (*PCNA-interacting protein*) tragen fungiert PCNA als molekulare Plattform für unterschiedliche Prozesse in der Zelle. Als PIP-Box wird ein Aminosäure-Sequenzmotiv mit einer Core-Konsensussequenz QxxI/L/V bezeichnet. Daneben gibt es auch Wechselwirkungen zwischen PCNA und zellulären Proteinen, die nicht über eine PIP-Box vermittelt werden (Moldovan *et al.*, 2007). So findet z. B. eine Bindung des Transkriptionsfaktors p300 (Hasan *et al.*, 2001; Hasan und Hottiger, 2002) oder der Proteinkinase CDK2 (Koundrioukoff *et al.*, 2000) auf einem PIP-Box unabhängi-

gen Weg statt, während die Interaktionen von PCNA mit p21 (*CDK-Inhibitor 1*) oder dem Tumorsuppressor p53 über ein PIP-Box-Motiv vermittelt werden (Hall *et al.*, 1995; Warbrick, 1998; Banks *et al.*, 2006). Derzeit sind über 46 humane Proteine bekannt, mit denen PCNA interagiert und auf diese Weise diverse Prozesse in humanen Zellen beeinflusst (Moldovan *et al.*, 2007). Durch seine Architektur als Homotrimer wäre es durchaus denkbar, dass PCNA gleichzeitig mit drei verschiedenen Proteinen Wechselwirkungen eingeht und dadurch seine Funktion exakt reguliert und gesteuert werden kann. In diesem Zusammenhang besitzt PCNA eine Funktion als molekulare Plattform. Es ist bekannt, dass PCNA in *S. cerevisiae* durch Mono- und Polyubiquitinylierung sowie SUMOylierung am hochkonservierten Lysinrests 164 (K164) für alternative DNA-Reparaturwege rekrutiert wird (Hoege *et al.*, 2002; Pfander *et al.*, 2005; Watts, 2006). Es wäre daher vorstellbar, dass durch posttranslationale Modifikationen die Substratspezifität von PCNA auch durch virale Proteine direkt oder indirekt verändert wird. Außerdem wurde gezeigt, dass PCNA zumindest *in vitro* ein essentieller Faktor für die DNA-Replikation von SV40 (*simian virus 40*) sowie *Saccharomyces cerevisiae* ist (Bauer und Burgers, 1988; Prelich und Stillman, 1988; McAlear *et al.*, 1994; Ayyagari *et al.*, 1995). In dieser Arbeit wurde PCNA mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybridsystems als Interaktionspartner von Ad5 E4orf3/4 auf Proteinebene identifiziert (5.3). Eine Bindung des adenoviralen Fusionsproteins an PCNA konnte jedoch weder in transient transfizierten noch in infizierten humanen Zellen nachgewiesen werden (5.4). Vermutlich ist dies durch die kurze Halbwertszeit von E4orf3/4 zu erklären (5.1.3). Bei den durchgeführten Koimmunpräzipitationsanalysen wurde jedoch E4orf4 als Bindungspartner von PCNA in transfizierten wie auch in Ad5-infizierten Zellen identifiziert (5.4.1). Da die 28 carboxyterminalen Aminosäuren von E4orf4 und E4orf3/4 identisch sind, binden möglicherweise beide adenoviralen E4-Proteine über ihren C-Terminus an PCNA. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von E4orf3/4 (ca. 14 min; Abb. 11) und der hohen Instabilität sowie der geringen Expressionsmengen C-terminal mutagenisierter E4orf4-Varianten (Abb. 17; Shtrichman *et al.*, 1999; Abb. 17; Marcellus *et al.*, 2000; Shtrichman *et al.*, 2000) ist eine genauere Analyse dieser Bindung schwierig. Es wäre ebenfalls vorstellbar, dass E4orf3/4 als virales SUMO-ähnliches Protein Funktionen von PCNA verändert und von Ad5 für eine effektive virale Replikation genutzt wird. Des Weiteren könnte E4orf3/4 ein virales Adaptermolekül darstellen, das über seinen C-Terminus zelluläre Proteine wie PCNA oder PP2A bindet und über seinen Aminoterminus das dort enthaltene SCS-Motiv (*SUMO conjugation site*) präsentiert (Abb. 6), wodurch über SUMOylierung die Substratspezifität dieser Proteine verändert wird. Ebenso wäre es möglich, dass auf diese Weise das NES

---

---

von E4orf3/4 zur Verfügung gestellt wird und zelluläre Exportfaktoren für virale Zwecke rekrutiert werden oder PCNA selbst aus dem Kern exportiert wird. Des Weiteren können die Daten aus den Transformations-*Assays* gut mit einer Wechselwirkung von E4orf3/4 mit PCNA in Verbindung gebracht werden. Da PCNA an zahlreichen unterschiedlichen Prozessen in der Zelle durch seine Funktionen als molekulare Plattform und Prozessivitätsfaktor zellulärer DNA-Polymerasen beteiligt ist (Moldovan *et al.*, 2007), wäre es durchaus möglich, dass E4orf3/4 dessen Funktionen bei verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen stört. Dadurch kommt es in E1A/E1B-55K-E4orf3/4-transformierten Zellen zur Anhäufung von Mutationen was in einer stark erhöhten *Focus*-Bildung zu beobachten ist (5.2). Für diese Theorie spricht, dass Ad5 Funktionen von PCNA nutzt und diese vermutlich auch beeinflusst, da die Genregulation von PCNA durch das virale E1A 12S-Genprodukt über zwei Strategien kontrolliert wird (Karuppayil *et al.*, 1998). E1A 12S aktiviert einerseits die Transkription von PCNA, während es andererseits die p53-abhängige transkriptionelle Aktivierung von PCNA reprimiert (Karuppayil *et al.*, 1998). Vor diesem Hintergrund und den Ergebnissen dieser Arbeit scheint PCNA ein strategisches Zielprotein im produktiven Infektionszyklus von Adenoviren zu sein. Durch weitere Analysen der Wechselwirkung von E4orf3/4 und E4orf4 mit PCNA könnten daher wichtige Daten gewonnen werden, wie diese und möglicherweise auch andere adenovirale Proteine PCNA als Plattform nutzen um die Wirtszelle für eine effektive Virusreplikation zu manipulieren.

## 6.6 Herstellung und Analyse von Ad5 E4-Nullmutanten

Um die Funktionen von E4orf3/4 im produktiven Infektionszyklus von Ad5 zu untersuchen, wurden entsprechende Virusmutanten die einzelne oder kombinierte Nullmutationen für E4orf3, E4orf4 und E4orf3/4 tragen, hergestellt. Bereits etablierte Systeme zur Herstellung von Adenovirusmutanten basieren auf der homologen Rekombination in Bakterienzellen (Chartier *et al.*, 1996; He *et al.*, 1998), wobei die Benutzung rekombinationskompetenter *E. coli* Stämme oftmals zu unerwünschten Veränderungen in der DNA-Sequenz (z. B. Deletionen) führt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein System verwendet, mit dem es möglich ist, schnell und effizient Punktmutanten im adenoviralen Genom zu erzeugen (5.5; Abb 18; Groitl und Dobner, 2007).

Die meisten Funktionen adenoviraler E4-Proteine im produktiven Replikationszyklus wurden traditionell mit Hilfe von Transfektions-/Infektionsexperimenten identifiziert. Dabei wurden

---

---

chimäre Ad2/Ad5-Deletionsmutanten verwendet, die Teildeletionen in einzelnen Leserahmen hatten oder bei denen eine ganze Transkriptionseinheit entfernt wurde. Anschließend wurden die Zellen mit Expressionsplasmiden, welche für die entsprechenden Leserahmen kodieren, transfiziert und analysiert (Ketner *et al.*, 1989). Diese Methode eröffnet zwar Einblicke auf die Funktionen der zu untersuchenden viralen Genprodukte, jedoch ist sie mit einer Reihe von Nachteilen verbunden. Zum einen sind die verwendeten Virusmutanten oftmals aus Sequenzen unterschiedlicher Adenovirustypen zusammengesetzt, wodurch die Interpretation von Ergebnissen kritisch geprüft werden muß. Zum anderen wird durch die Deletionen das Spleißschema der entsprechenden Transkriptionseinheit beeinflusst. Des Weiteren können unter Umständen wichtige virale Regulatorproteine ausfallen, wodurch eine Interpretation der Ergebnisse weiter erschwert wird. Probleme treten bei dieser Methode auch durch die nachfolgende Transfektion auf. Außerdem werden die transfizierten Expressionsplasmide nicht in stöchiometrischen Mengen in die Zellen aufgenommen. Daneben stehen bei den verwendeten Plasmiden die adenoviralen Genprodukte nicht immer unter der Kontrolle ihres natürlichen Promotors und werden folglich überexprimiert. Vor allem sind Ad-Deletionsmutanten für die Erforschung der E4-Region kritisch zu betrachten, da gerade in einer so intensiv gespleißten Region durch Sequenzdeletionen zum einen massiv das Spleißmuster verändert wird und zum andern kaum Nullmutationen für einzelne E4-Leserahmen erzeugt werden können.

Eine wesentlich elegantere und aussagekräftigere Methode bietet das in dieser Arbeitsgruppe entwickelte direkte Klonierungssystem (Abb. 18; Groitl und Dobner, 2007), womit auf einem E4-Box-Plasmid exakte Punktmutationen gesetzt werden können. Durch das Rückklonieren dieser mutagenisierten E4-Regionen in das Ad5-Genom ist es möglich infektiöse Virusmutanten mit einem typenreinen Genom zu generieren, was eine genauere Beurteilung der Ergebnisse ermöglicht.

### **6.6.1 Einfluss der E4-Nullmutationen auf die virale Proteinexpression**

Aufgrund von Gemeinsamkeiten in der Aminosäuresequenz von E4orf3/4 mit E4orf3 und E4orf4 wurden in dieser Arbeit verschiedene Ad5 E4-Nullmutanten hergestellt (5.5). Bei der Analyse der Gleichgewichtsmengen einiger früher E1, E2 und E4-Proteine konnten neben dem Verlust der entsprechenden E4-Proteine aufgrund der eingeführten Mutationen auch Unterschiede in der E1B-55K- und E4orf6-Expression beobachtet werden (Abb. 27). E4orf4-ne-

gative Ad5-Mutanten zeigen dabei im Vergleich zum Ad5-wt erhöhte E1B-55K- sowie E4orf6-Gleichgewichtsmengen. Diese Beobachtung ist konsistent mit bereits veröffentlichten Daten (Bondesson *et al.*, 1996; Medghalchi *et al.*, 1997; Whalen *et al.*, 1997; Miron *et al.*, 2009) und wird derzeit über das Fehlen der negativen transkriptionellen Regulatorfunktion von E4orf4 erklärt. Durch die in dieser Arbeit generierten Einfach-, Doppel- und Dreifach-Nullmutanten konnten erstmals Einblicke über mögliche redundante Funktionen von E4orf3, E4orf4 und E4orf3/4 gewonnen werden. Beispielsweise akkumulieren die E4orf6-Proteinmengen in Ad5 E4orf3/4-infizierten Zellen im zeitlichen Verlauf der Infektion stärker als in Ad5 wt-infizierten Zellen, während bei gleichzeitigem Fehlen von E4orf3 und E4orf3/4 die E4orf6-Mengen signifikant reduziert sind (Abb. 27). In E4orf4- und E4orf3/4-negativen Ad5-Mutanten wird dagegen E4orf6 stärker exprimiert als beim Ad5 wt. In diesem Zusammenhang scheinen E4orf3 und E4orf3/4 mögliche funktionelle Überlappungen zu besitzen, die jedoch durch das Fehlen von E4orf4 in den Doppelnulmutanten Ad5 E4orf3<sup>-</sup> 4<sup>-</sup> und Ad5 E4orf4<sup>-</sup> 3/4<sup>-</sup> kompensiert wird. Die redundanten Funktionen sind vermutlich auf den gemeinsamen Aminoterminus von E4orf3 und E4orf3/4 zurückzuführen (Abb. 6). Umgekehrt wirken sich die Nullmutationen auf die E1B-55K-Expression aus. Während die Einfachmutante Ad5 E4orf4<sup>-</sup> erhöhte E1B-55K-Mengen exprimiert, sind diese bei der Doppelmutante Ad5 E4orf4<sup>-</sup> 3/4<sup>-</sup> reduziert. Dagegen exprimiert Ad5 E4orf3<sup>-</sup> 3/4<sup>-</sup> E1B-55K-Gleichgewichtsmengen ähnlich wie der Ad5 wt (Abb. 28). Überraschend ist jedoch, dass die Dreifach-Nullmutante Ad5 E4orf3<sup>-</sup> 4<sup>-</sup> 3/4<sup>-</sup> sowohl einen stärkeren Defekt in der E1B-55K- sowie der E4orf6-Expression besitzt. Im Gegensatz dazu ist die Doppelmutante Ad5 E4orf3<sup>-</sup> 4<sup>-</sup> für diese Proteine nicht defekt und exprimiert diese in Mengen wie der Wildtyp. Diese Beobachtung impliziert, dass E4orf3, E4orf4 und E4orf3/4 redundante Funktionen besitzen, die teilweise durch eines dieser E4-Proteine kompensiert werden können. Am deutlichsten zeigt sich der defekte Phänotyp der Dreifach-Nullmutante in der Expression später viraler Strukturproteine (Abb. 29). Vergleicht man die Ad5 E4-Mutanten untereinander fällt auf, dass E4orf4-negative Virusmutanten erhöhte Gleichgewichtsmengen an Strukturproteinen im Vergleich zum Ad5 wt exprimieren, was sich wiederum mit bereits veröffentlichten Daten deckt und auf das Fehlen der negativ-regulatorischen Funktion von E4orf4 zugeschrieben wird (Bondesson *et al.*, 1996; Medghalchi *et al.*, 1997; Whalen *et al.*, 1997; Miron *et al.*, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass Ad5 E4orf3/4<sup>-</sup> reduzierte Mengen an Pentonbasisprotein und Fiber exprimiert (Abb. 29). Bei gleichzeitigem Fehlen von E4orf3, E4orf4 und E4orf3/4 werden kaum mehr späte Strukturproteine exprimiert. Verglichen mit der Doppelmutante Ad5 E4orf3<sup>-</sup> 4<sup>-</sup>, die ähnliche Mengen wie der Wildtyp expri-

---

---

miert, gibt dies einen Hinweis auf eine Beteiligung von E4orf3/4 an der Strukturproteinsynthese. Über einen Mechanismus in dem E4orf3/4 die Proteinexpression beeinflusst, kann derzeit nur spekuliert werden. Möglicherweise beeinflusst dabei E4orf3/4 den Übergang von der frühen zur späten Phase des viralen Replikationszyklus. Aufgrund der Tatsache, dass E4orf3, E4orf4 und E4orf3/4 gemeinsame Aminosäuresequenzen teilen erscheint eine Überlappung der damit verbundenen Funktionen als wahrscheinlich. Durch die Bindung von E4orf4 und vermutlich auch E4orf3/4 in humanen Zellen an PCNA könnten möglicherweise diese redundanten Funktionen erklärt werden.

### 6.6.2 Einfluss von E4orf3/4 auf die virale DNA-Replikation

Um die virale DNA-Replikation der neu generierten E4-Nullmutanten zu untersuchen, wurde ein DNA-Replikations-Assay durchgeführt (5.6.4). Dabei zeigte sich, dass die E4orf3/4-negative Virusmutante eine signifikant höhere DNA-Replikation im Vergleich zu den anderen Virusmutanten aufweist (Abb. 31). Interessanterweise ist diese Ad5-Mutante in der Expression früher wie später viraler Proteine dem Ad5-wt sehr ähnlich (Abb. 27; 28; 29). Vergleicht man das Bandenmuster von Ad5 E4orf3/4 mit dem Wildtyp, scheint E4orf3/4 eine negativ-regulatorische Funktion auf die DNA-Replikation zu besitzen. Die E4-Doppelmutanten zeigen im Vergleich zum Wildtyp akkumulierende DNA-Mengen. Während die Einfach-Nullmutanten zwar 24 h p.i. ein starkes Signal aufwies, zeigten sie im weiteren Verlauf der Infektion aber wt-ähnliche DNA-Mengen (Abb. 31). Im Gegensatz zu den Einfach- und Doppelnulmutanten ist die Dreifachmutante Ad5 E4orf3<sup>-</sup> 4<sup>-</sup> 3/4<sup>-</sup> auch in der DNA-Replikation stark defekt (Abb. 31). Ähnlich wie bei der Proteinexpression scheinen E4orf3, E4orf4 und E4orf3/4 auch bei der DNA-Replikation redundante Funktionen zu besitzen, wobei der gleichzeitige Verlust dieser drei E4-Proteine eine negative Auswirkung auf die DNA-Replikation hat. Ad5-Virusmutanten denen die E4-Region fehlt (H5dl1007; H5dl1011) haben bei Infektionen mit einer niedrigen moi einen komplexen Phänotyp und sind in der DNA-Replikation sowie in der Expression später Strukturproteine defekt. Der DNA-Replikationsdefekt dieser Mutanten kann jedoch bei Infektionen mit einer hohen moi von 50 pfu/Zelle (*plaque forming units*) kompensiert werden (Brackmann *et al.*, 1980; Halbert *et al.*, 1985; Weinberg und Ketner, 1986; Bridge und Ketner, 1989; Huang und Hearing, 1989). In dieser Arbeit wurden die Analysen mit einer niedrigen moi von 5 ffu/Zelle durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Ad5 E4orf3<sup>-</sup> 4<sup>-</sup> 3/4<sup>-</sup>-Mutante auch in der Expression von E4orf6 stark defekt ist. Durch die kaum nachweisbaren

---

---

E4orf6-Gleichgewichtsmengen unter den gewählten Versuchsbedingungen (moi 5 *ffu*/Zelle) erklärt sich möglicherweise der stark defekte Phänotyp dieser Mutante bei der DNA-Replikation. Des Weiteren gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass E4orf3, E4orf4 und E4orf6 eine regulatorische Funktion für die virale DNA-Akkumulation besitzen (Brackmann *et al.*, 1980; Halbert *et al.*, 1985; Weinberg und Ketner, 1986; Bridge und Ketner, 1989; Huang und Hearing, 1989; Bridge *et al.*, 1993). Diese Beobachtungen passen in den Kontext der Wechselwirkung von E4orf4 und E4orf3/4 mit PCNA. Da PCNA ein Kofaktor für DNA-Polymerasen ist sowie diverse Funktionen als molekulare Plattform besitzt (Moldovan *et al.*, 2007), wäre es vorstellbar dass E4orf3, E4orf4, E4orf3/4 und E4orf6 die virale DNA-Replikation unter anderem über Wechselwirkungen mit PCNA regulieren.

### 6.6.3 Funktionen von E4orf3/4 bei der Produktion von Nachkommenviren

Um weitere Funktionen und Auswirkungen der E4-Nullmutationen im produktiven Replikationszyklus von Ad5 zu identifizieren wurde zu den Proteinexpressions- und DNA-Replikationsanalysen die Fähigkeit zur Nachkommenvirusproduktion untersucht (5.6.5). Da sich die in dieser Arbeit generierten Ad5-Mutanten unter anderem in den E4orf6-Expressionsmengen unterscheiden, wurden für diese Analysen zwei weitere E4-Mutanten hinzugezogen. Es stellte sich heraus, dass konsistent zu veröffentlichten Daten die Einfach-Nullmutanten Ad5 E4orf3- und Ad5 E4orf4- keinen Defekt in der Nachkommenvirusproduktion zeigen (Shepard und Ornelles, 2004; Miron *et al.*, 2009). Die Mutante Ad5 E4orf3/4- zeigte ebenfalls keinen Replikationsdefekt. Interessanterweise zeigten die E4-Doppelnullmutanten Ad5 E4orf3- 4-, Ad5 E4orf3- 3/4- und Ad5 E4orf4- 3/4- eine wt-ähnliche Virusreplikation (Abb. 32). Dieses Ergebnis ist konsistent zu den Daten der Proteinexpressionsanalysen (5.6.2), in denen sich zeigte, dass diese Ad5 E4-Mutanten ausser den Nullmutationen nur leichte Unterschiede in den Gleichgewichtsmengen anderer viraler Proteine aufweisen (Abb. 27; 28; 29). Obwohl die Einfach- und Doppel-Nullmutanten Unterschiede im DNA-Replikations-*Assay* zeigten (Abb. 31), wirkt sich dieses Ergebnis nicht negativ auf die Produktion viraler Nachkommenpartikel aus (Abb. 32). Die Dreifachmutante Ad5 E4orf3- 4 3/4- besitzt einen ähnlich replikationsdefekten Phänotyp wie die Mutante Ad5 E4orf3- 6- (Abb.32, Spur 10). Durch die stark reduzierte Expression von E1B-55K, E4orf6 sowie L4-100K bei der Dreifachmutante, ist vermutlich dieser stark defekte Phänotyp zu erklären. Konsistent zu früheren Veröffentlichungen sind E4orf6-

---

---

negative Ad5-Mutanten replikationsdefekt, wobei dieser Defekt durch gleichzeitiges Fehlen von E4orf3 zusätzlich verstärkt wird (Abb. 32) (Huang und Hearing, 1989; Goodrum und Ornelles, 1999). Die Dreifach-Nullmutante exprimiert weder E4orf3, E4orf4 und E4orf3/4, während die Expression von E1B-55K, E4orf6 und L4-100K nur schwach und bei sehr langen Expositionszeiten nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die geringen, vermutlich nicht funktionellen Gleichgewichtsmengen von E1B-55K, E4orf6 und L4-100K sind auf die niedrige *moi* (5 *ffu*/Zelle) mit der die Versuche gemacht wurden zurückzuführen. In früheren Studien wurde gezeigt, dass E1B-55K/E4orf3-, E1B-55K/E4orf6- und E4orf3/E4orf6-defekte Ad-Mutanten einen stark defekten Phänotyp besitzen (Huang und Hearing, 1989; Goodrum und Ornelles, 1999). Bei gleichzeitigem Fehlen von E1B-55K, E4orf6 oder E4orf3, kann die DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur nicht mehr gehemmt werden. Des Weiteren ist die Inhibition und Degradation des Tumorsuppressors p53 nicht möglich, da sich der E3-Ubiquitin-ligase-Komplex nicht mehr bilden kann (Querido *et al.*, 2001; Blanchette *et al.*, 2008). Damit ist auch ein Defekt im *host cell shutoff* und dem selektiven mRNA-Export viraler Transkripte verbunden (Babich *et al.*, 1983; Babiss und Ginsberg, 1984; Babiss *et al.*, 1985; Pilder *et al.*, 1986). Aufgrund der sehr geringen Mengen von E1B-55K und L4-100K und den damit verbundenen Ausfall ihrer Funktionen ist bei der Dreifachmutante unter anderem auch der Defekt in der Strukturproteinsynthese zu erklären (Koyuncu, 2009). Die sehr schwache Expression dieser essenziellen adenoviralen Genprodukte führt vermutlich zu dem starken Replikationsdefekt von Ad5 E4orf3-4-3/4, wobei die Ergebnisse aus den Proteinexpressionsanalysen sowie der Untersuchung der DNA-Replikation diese Annahme stärken.

## 6.7 Nachweis von E4orf3/4

Um die Daten aus den Transfektionsexperimenten und der Charakterisierung der Ad5 E4-Nullmutanten tatsächlich mit dem E4orf3/4-Protein in Verbindung zu bringen, war es in dieser Arbeit wichtig dieses adenovirale Fusionsprotein in virusinfizierten Zellen nachzuweisen. Wie aus den Transfektionsexperimenten hervorging, besitzt E4orf3/4 eine sehr kurze Halbwertszeit von nur 14 min (Abb. 11). Wie bereits erwähnt (6.1) gibt es Hinweise darauf, dass in virusinfizierten Zellen die mRNA von E4orf3/4 in sehr geringen Mengen exprimiert wird, was möglicherweise mit einer sehr schwachen Expression des E4orf3/4-Genprodukts in Verbindung steht (Abb. 25; Virtanen *et al.*, 1984). Da der E4orf4-spezifische Antikörper zu viele unspezifische Hintergrundsignale für eine Detektion eines schwach exprimierten Proteins lie-

---

---

fert, war es notwendig entweder E4orf3/4-spezifische Antikörper herzustellen oder das Klonierungssystem zu nutzen, um E4orf3/4 detektierbar zu machen. Da es nicht möglich war einen E4orf3/4-spezifischen Antikörper zu generieren wurde mit Hilfe des Klonierungssystems die FLAG-Sequenz auf genetischer Ebene in den Leserahmen von E4orf3 inseriert um ein N-terminal FLAG-fusioniertes E4orf3 und E4orf3/4 zu exprimieren (5.7.1). Dabei wurde darauf geachtet keinen Leserahmen in der E4-Region durch Insertionsmutagenese zu zerstören. Obwohl frühere Arbeiten bereits zeigten, dass es möglich ist die Sequenz für das 238 As große GFP (*green fluorescent protein*) an den N-Terminus von E4orf4 zu klonieren, ohne dabei einen replikationsdefekten Phänotyp zu generieren (Miron *et al.*, 2009), wurde diese Option für den Nachweis von E4orf3/4 nicht gewählt. Eine C-terminale Fusion von E4orf3/4 bzw. E4orf4 mit GFP würde das E4orf6-Genprodukt zerstören, wodurch eine replikationsdefekte Virusmutante entstehen würde. Eine klonale Insertion der GFP-Sequenz an den N-Terminus von E4orf3 würde durch die Überlappung von E4orf2 mit E4orf3 vermutlich zum Ausfall von E4orf2 führen. Obwohl GFP für fluoreszenzmikroskopische Analysen einen gewissen Vorteil bietet, da sich dadurch die Verwendung von Antikörpern vermeiden lässt, ist eine Fusion des 238 As großen Proteins an das nur 61 Aminosäuren lange E4orf3/4 aufgrund des vierfachen Größenunterschieds wenig sinnvoll. Vermutlich würden auch die Eigenschaften von E4orf3/4 durch GFP stark beeinflusst werden, wodurch sich weitere Probleme für den Nachweis von E4orf3/4 und dessen subzellulärer Lokalisation ergeben würden. Durch die in dieser Arbeit verwendete minimal-invasive Methode konnte die Sequenz für das FLAG-Epitop für das nur acht Aminosäure lange FLAG-Epitop in den Leserahmen von E4orf3 inseriert werden, ohne dabei den Leserahmen von E4orf2 zu zerstören. Außerdem wurde das Spleißen in der E4-Region nicht verändert, da in *Western Blot*-Analysen gezeigt werden konnte, dass *downstream* gelegene E4-Proteine, wie E4orf6, durch die Insertion des FLAG-Epitops weder zerstört noch deren Expressionsmengen beeinflusst werden (Abb. 34) und FLAG-fusioniertes E4orf3 wie erwartet exprimiert wird (Abb. 34). Dies spricht gegen eine generelle Veränderung des Spleißschemas in der E4-Region durch die FLAG-Insertion. Würde durch die Insertion das Spleißmuster verändert werden, würde dies zu einem Verlust von E4orf3 und *downstream* gelegenen Genprodukten und somit zu einem replikationsdefekten Phänotyp führen (vgl. 6.6.3).

Durch die Kombination eines E4orf3- und eines FLAG-spezifischen Antikörpers und der Ad5-Mutante FLAG-E4orf3 3/4 war es möglich die Expression von E4orf3/4 in virusinfizierten Zellen mittels fluoreszenzlichtmikroskopischen und laserkonfokalmikroskopischen Analysen nachzuweisen. Somit konnte erstmals die Existenz des adenoviralen Fusionsproteins E4orf3/4

in virusinfizierten Zellen gezeigt werden (5.7). Außerdem konnte die Vermutung, dass E4orf3/4 möglicherweise nur sehr schwach exprimiert wird, sowie auch in virusinfizierten Zellen eine kurze Halbwertszeit besitzt, indirekt bestätigt werden (5.7; Abb. 35; 36).

## 7 Literaturverzeichnis

---

---

- Abe S, Miyamura K, Oba T, Terakura S, Kasai M, Kitaori K, Sasaki T and Kodera Y.** (2003). Oral ribavirin for severe adenovirus infection after allogeneic marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 32, 1107-8.
- Akusjarvi G and Persson H.** (1981). Controls of RNA splicing and termination in the major late adenovirus transcription unit. *Nature.* 292, 420-6.
- Alemaný R, Balagué C and Curiel DT.** (2000). Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotech.* 18, 723-727.
- Ankerst J and Jonsson N.** (1989). Adenovirus type 9-induced tumorigenesis in the rat mammary gland related to sex hormonal state. *J Natl Cancer Inst.* 81, 294-298.
- Ankerst J, Jonsson N, Kjellen L, Norrby E and Sjogren HO.** (1974). Induction of mammary fibroadenomas in rats by adenovirus type 9. *Int J Cancer.* 13, 286-290.
- Araujo FD, Stracker TH, Carson CT, Lee DV and Weitzman MD.** (2005). Adenovirus type 5 E4orf3 protein targets the Mre11 complex to cytoplasmic aggresomes. *J Virol.* 79, 11382-91.
- Armentano D, Zabner J, Sacks C, Sookdeo CC, Smith MP, St. George JA, Wadsworth SC, Smith AE and Gregory RJ.** (1997). Effect of the E4 region on the persistence of transgene expression from adenovirus vectors. *J Virol.* 71, 2408-2416.
- Ayyagari R, Impellizzeri KJ, Yoder BL, Gary SL and Burgers PM.** (1995). A mutational analysis of the yeast proliferating cell nuclear antigen indicates distinct roles in DNA replication and DNA repair. *Mol Cell Biol.* 15, 4420-9.
- Babich A, Feldman LT, Nevins JR, Darnell JE and Weinberger C.** (1983). Effect of adenovirus on metabolism of specific host mRNAs: transport control and specific translation discrimination. *Mol Cell Biol.* 3, 1212-1221.
- Babiss LE and Ginsberg HS.** (1984). Adenovirus type 5 early region 1b gene product is required for efficient shutoff of host protein synthesis. *J Virol.* 50, 202-212.
- Babiss LE, Ginsberg HS and Darnell JJ.** (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 Mautner V.** (1994). Phylogenetic relationships among adenovirus serotypes. *Virology.* 205, 438-452.
- Banks D, Wu M, Higa LA, Gavrillova N, Quan J, Ye T, Kobayashi R, Sun H and Zhang H.** (2006). L2DTL/CDT2 and PCNA interact with p53 and regulate p53 polyubiquitination and protein stability through MDM2 and CUL4A/DDB1 complexes. *Cell Cycle.* 5, 1719-29.

- Barker DD and Berk AJ.** (1987). Adenovirus proteins from both E1B reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection. *Virology*. 156, 107-121.
- Bauer GA and Burgers PM.** (1988). Protein-protein interactions of yeast DNA polymerase III with mammalian and yeast proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin. *Biochim Biophys Acta*. 951, 274-9.
- Beck KF, Stathopoulos I, Berninger MG and Schweizer M.** (1993). Overcoming GC compression in nucleotide sequencing. *Biotechniques*. 14, 375.
- Beltz GA and Flint SJ.** (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, Elo P, Ursu K, Ahne W, LaPatra SE, Thomson D and Harrach B.** (2002). First molecular evidence for the existence of distinct fish and snake adenoviruses. *J Virol*. 76, 10056-9.
- Benkő M and Harrach B.** (1998). A proposal for a new (third) genus within the family Adenoviridae. *Arch Virol*. 143, 829-837.
- Benkő M, Harrach B and Russel WC.** (1999). *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Van Regenmortel Mhv, Fauquet Cm and Bishop Dhl (eds). Academic Press: San Diego, pp 227-238.
- Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL and Finberg RW.** (1997). Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*. 275, 1320-1323.
- Bernards R, de Leeuw MG, Vaessen MJ, Houweling A and van der Eb AJ.** (1984). Oncogenicity by adenovirus is not determined by the transforming region only. *J Virol*. 50, 847-853.
- Bernards R, Houweling A, Schrier PI, Bos JL and van der Eb AJ.** (1982). Characterization of cells transformed by Ad5/Ad12 hybrid early region I plasmids. *Virology*. 120, 422-432.
- Bernards R, Schrier PI, Bos JL and Van der Eb AJ.** (1983). Role of adenovirus types 5 and 12 early region 1b tumor antigens in oncogenic transformation. *Virology*. 127, 45-53.
- Bernards R and Van der Eb AJ.** (1984). Adenovirus: transformation and oncogenicity. *Biochim Biophys Acta*. 783, 187-204.
- Beyer WR, Westphal M, Ostertag W and von Laer D.** (2002). Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range. *J Virol*. 76, 1488-95.
- Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, Ng L, Nye JA, Sampson Johannes A, Fattaey A and McCormick F.** (1996). An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*. 274, 373-376.

- Blanchette P, Cheng CY, Yan Q, Ketner G, Ornelles DA, Dobner T, Conaway RC, Conaway JW and Branton PE.** (2004). Both BC-box motifs of adenovirus protein E4orf6 are required to efficiently assemble an E3 ligase complex that degrades p53. *Mol Cell Biol.* 24, 9619-29.
- Blanchette P, Kindsmuller K, Groitl P, Dallaire F, Speiseder T, Branton PE and Dobner T.** (2008). Control of mRNA export by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins during productive infection requires E4orf6 ubiquitin ligase activity. *J Virol.* 82, 2642-51.
- Bogerd HP, Fridell RA, Benson RE, Hua J and Cullen BR.** (1996). Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay. *Mol Cell Biol.* 16, 4207-14.
- Boivin D, Morrison MR, Marcellus RC, Querido E and Branton PE.** (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.
- Bondesson M, Öhman K, Mannervik M, Fan S and Akusjärvi G.** (1996). Adenovirus E4 open reading frame 4 protein autoregulates E4 transcription by inhibiting E1A transactivation of the E4 promoter. *J Virol.* 70, 3844-3851.
- Boyer JL, Rohleder K and Ketner G.** (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.
- Brackmann KH, Green M, Wold WS, Cartas M, Matsuo T and Hashimoto S.** (1980). Identification and peptide mapping of human adenovirus type 2-induced early polypeptides isolated by two-dimensional gel electrophoresis and immunoprecipitation. *J Biol Chem.* 255, 6772-6779.
- Bradford MM.** (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.
- Branton PE and Roopchand DE.** (2001). The role of adenovirus E4orf4 protein in viral replication and cell killing. *Oncogene.* 20, 7855-7865.
- Bray M, Prasad S, Dubay JW, Hunter E, Jeang KT, Rekosh D and Hammarskjöld ML.** (1994). A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 1256-60.
- Bridge E.** (2000). Letter to the editor. *J Virol.* 74, 12000-12001.
- Bridge E and Ketner G.** (1989). Redundant control of adenovirus late gene expression by early region 4. *J Virol.* 63, 631-638.
- Bridge E, Medghalchi S, Ubol S, Leesong M and Ketner G.** (1993). Adenovirus early region 4 and viral DNA synthesis. *Virology.* 193, 794-801.

- Brough DE, Hsu H, Kulesa VA, Lee GM, Cantolupo LJ, Lizonova A and Kovesdi I.** (1997). Activation of transgene expression by early region 4 is responsible for a high level of persistent transgene expression from adenovirus vectors in vivo. *J Virol.* 71, 9206-9213.
- Brusca JS, Jannun R and Chinnadurai G.** (1984). Efficient transformation of rat 3Y1 cells by human adenovirus type 9. *Virology.* 136, 328-337.
- Burgert HG and Blusch JH.** (2000). Immunomodulatory functions encoded by the E3 transcription unit of adenoviruses. *Virus Genes.* 21, 13-25.
- Byrd P, Brown KW and Gallimore PH.** (1982). Malignant transformation of human embryo retinoblasts by cloned adenovirus 12 DNA. *Nature.* 298, 69-71.
- Carson CT, Schwartz RA, Stracker TH, Lilley CE, Lee DV and Weitzman MD.** (2003). The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. *Embo J.* 22, 6610-20.
- Carvalho T, Seeler JS, Öhman K, Jordan P, Pettersson U, Akusjärvi G, Carmo Fonseca M and Dejean A.** (1995). Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies. *J Cell Biol.* 131, 45-56.
- Catalucci D, Sporeno E, Cirillo A, Ciliberto G, Nicosia A and Colloca S.** (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.
- Chartier C, Degryse E, Gantzer M, Dieterle A, Pavirani A and Mehtali M.** (1996). Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J Virol.* 70, 4805-4810.
- Chauvin C, Suh M, Remy C and Benabid AL.** (1990). Failure to detect viral genomic sequences of three viruses (herpes simplex, simian virus 40 and adenovirus) in human and rat brain tumors. *Ital J Neurol Sci.* 11, 347-357.
- Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R and Fields S.** (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88, 9578-9582.
- Chinnadurai G.** (1998). Control of apoptosis by human adenovirus genes. *Semin Virol.* 8, 399-408.
- Christ M, Louis B, Stoeckel F, Dieterle A, Grave L, Dreyer D, Kintz J, Ali Hadji D, Lusky M and Mehtali M.** (2000). Modulation of the inflammatory properties and hepatotoxicity of recombinant adenovirus vectors by the viral E4 gene products. *Hum Gene Ther.* 11, 415-427.
- Collis SJ, Ketner GW, Hicks JL, Nelson WG, Demarzo AM and Deweese TL.** (2003). Expression of the DNA-PK binding protein E4-34K fails to confer radiation sensitivity to mammalian cells. *Int J Radiat Biol.* 79, 53-60.
- Cook JL and Lewis AM, Jr.** (1987). Immunological surveillance against DNA-virus-transformed cells: correlations between natural killer cell cytolytic competence and tumor

- susceptibility of athymic rodents. *J Virol.* 61, 2155-61.
- Cutt JR, Shenk T and Hearing P.** (1987). Analysis of adenovirus early region 4-encoded polypeptides synthesized in productively infected cells. *J Virol.* 61, 543-552.
- Davison AJ, Benko M and Harrach B.** (2003). Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol.* 84, 2895-908.
- Davison AJ, Telford EA, Watson MS, McBride K and Mautner V.** (1993). The DNA sequence of adenovirus type 40. *J Mol Biol.* 234, 1308-1316.
- Dedieu JF, Vigne E, Torrent C, Jullien C, Mahfouz I, Caillaud JM, Aubailly N, Orsini C, Guillaume JM, Opolon P, Delaere P, Perricaudet M and Yeh P.** (1997). Long-term gene delivery into the livers of immunocompetent mice with E1/E4-defective adenoviruses. *J Virol.* 71, 4626-4637.
- Dellaire G and Bazett-Jones DP.** (2004). PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays.* 26, 963-77.
- Dix BR, Edwards SJ and Braithwaite AW.** (2001). Does the antitumor adenovirus ONYX-015/dl1520 selectively target cells defective in the p53 pathway? *J Virol.* 75, 5443-5447.
- Dix I and Leppard KN.** (1993). Regulated splicing of adenovirus type 5 E4 transcripts and regulated cytoplasmic accumulation of E4 mRNA. *J Virol.* 67, 3226-3231.
- Dix I and Leppard KN.** (1995). Expression of adenovirus type 5 E4 Orf2 protein during lytic infection. *J Gen Virol.* 76, 1051-1055.
- Dobner T, Horikoshi N, Rubenwolf S and Shenk T.** (1996). Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor. *Science.* 272, 1470-1473.
- Doerr HG, WH.** (2009). Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen. *Thieme Verlag, Stuttgart.* 2. kompl. überarb. u. erw. Aufl.
- Dörfler W.** (1996). A new concept in adenoviral oncogenesis: integration of foreign DNA and its consequences. *Biochim Biophys Acta.* 1288, F79-F99.
- Dosch T, Horn F, Schneider G, Krätzer F, Dobner T, Hauber J and Stauber RH.** (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 Evans RM.** (1996). The PML nuclear compartment and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1288, M25-9.
- Doucas V, Ishov AM, Romo A, Juguilon H, Weitzman MD, Evans RM and Maul GG.** (1996). Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure. *Genes Dev.* 10, 196-207.
- Downey JF, Rowe DT, Bacchetti S, Graham FL and Bayley ST.** (1983). Mapping of a 14,000-dalton antigen to early region 4 of the human adenovirus 5 genome. *J Virol.* 45, 514-523.

- Dulbecco R and Freeman G.** (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology*. 8, 396-7.
- Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D and Naldini L.** (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*. 72, 8463-71.
- Durfee T, Becherer K, Chen PL, Yeh SH, Yang Y, Kilburn AE, Lee WH and Elledge SJ.** (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev*. 7, 555-569.
- Enders JF, Bell JA and Dingle JH.** (1956). "Adenoviruses": group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science*. 124, 119-120.
- Endter C and Dobner T.** (2004). Cell transformation by human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*. 273, 163-214.
- Endter C, Kzhyshkowska J, Stauber R and Dobner T.** (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.
- Esche H.** (1982). Viral gene products in adenovirus type 2-transformed hamster cells. *J Virol*. 41, 1076-1082.
- Esche H, Schilling R and Dörfler W.** (1979). In vitro translation of adenovirus type 12-specific mRNA isolated from infected and transformed cells. *J Virol*. 30, 21-31.
- Esche H and Siegman B.** (1982). Expression of early viral gene products in adenovirus type 12-infected and -transformed cells. *J Gen Virol*. 60, 99-113.
- Evans JD and Hearing P.** (2003). Distinct Roles of the Adenovirus E4 ORF3 Protein in Viral DNA Replication and Inhibition of Genome Concatenation. *J Virol*. 77, 5295-5304.
- Fallaux FJ, Kranenburg O, Cramer SJ, Houweling A, Van Ormondt H, Hoeben RC and Van Der Eb AJ.** (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.
- Fields S and Song O.** (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*. 340, 245-6.
- Fischer U, Meyer S, Teufel M, Heckel C, Luhrmann R and Rautmann G.** (1994). Evidence that HIV-1 Rev directly promotes the nuclear export of unspliced RNA. *Embo J*. 13, 4105-12.
- Flint SJ.** (1986). Regulation of adenovirus mRNA formation. *Adv Virus Res*. 31, 169-228.
- Flint SJ, Gallimore PH and Sharp PA.** (1975). Comparison of viral RNA sequences in adenovirus 2-transformed and lytically infected cells. *J Mol Biol*. 96, 47-68.
- Flint SJ, Sambrook J, Williams JF and Sharp PA.** (1976). Viral nucleic acid sequences in transformed cells. IV. A study of the sequences of adenovirus 5 DNA and RNA in four

- lines of adenovirus 5-transformed rodent cells using specific fragments of the viral genome. *Virology*. 72, 456-470.
- Flint SJ and Sharp PA.** (1976). Adenovirus transcription. V. Quantitation of viral RNA sequences in adenovirus 2-infected and transformed cells. *J Mol Biol*. 106, 749-771.
- Fogal V, Gostissa M, Sandy P, Zacchi P, Sternsdorf T, Jensen K, Pandolfi PP, Will H, Schneider C and Del Sal G.** (2000). Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *EMBO J*. 19, 6185-6195.
- Frese KK, Lee SS, Thomas DL, Latorre IJ, Weiss RS, Glaunsinger BA and Javier RT.** (2003). Selective PDZ protein-dependent stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by the adenovirus E4-ORF1 oncoprotein. *Oncogene*. 22, 710-21.
- Freyer GA, Katoh Y and Roberts RJ.** (1984). Characterization of the major mRNAs from adenovirus 2 early region 4 by cDNA cloning and sequencing. *Nucl Acids Res*. 12, 3503-3519.
- Gallimore PH, Byrd PJ, Whittaker JL and Grand RJ.** (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 PH, Grand RJ and Byrd PJ.** (1986). Transformation of human embryo retinoblasts with simian virus 40, adenovirus and ras oncogenes. *Anticancer Res*. 6, 499-508.
- Gao GP, Yang Y and Wilson JM.** (1996). Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy. *J Virol*. 70, 8934-8943.
- Garnett CT, Talekar G, Mahr JA, Huang W, Zhang Y, Ornelles DA and Gooding LR.** (2009). Latent species C adenoviruses in human tonsil tissues. *J Virol*. 83, 2417-28.
- Giard RJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H and Parks WP.** (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.
- Glaunsinger BA, Weiss RS, Lee SS and Javier RT.** (2001). Link of the unique oncogenic properties of adenovirus type 9 E4-ORF1 to a select interaction with the candidate tumor suppressor protein ZO-2. *EMBO J*. 20, 5578-5586.
- Golemis EA and Khazak V.** (1997). Alternative yeast two-hybrid systems. The interaction trap and interaction mating. *Methods Mol Biol*. 63, 197-218.
- Gómez-Navarro JG and Curiel DT.** (2000). Conditionally replicative adenoviral vectors for cancer gene therapy. *The Lancet*. 1, 148-158.
- Gooding LR and Wold WS.** (1990). Molecular mechanisms by which adenoviruses counteract antiviral immune defenses. *Crit Rev Immunol*. 10, 53-71.
- Goodrum FD and Ornelles DA.** (1999). Roles for the E4 orf6, orf3, and E1B 55-kilodalton proteins in cell cycle-independent adenovirus replication. *J Virol*. 73, 7474-7488.

- Gorlich D.** (1997). Nuclear protein import. *Curr Opin Cell Biol.* 9, 412-9.
- Graham FL.** (1984). *The adenoviruses.* Ginsberg Hs (ed.). Plenum Press: New York, pp 339-398.
- Graham FL, Smiley J, Russel WC and Nairn R.** (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 36, 59-72.
- Grand RJ, Grant ML and Gallimore PH.** (1994). Enhanced expression of p53 in human cells infected with mutant adenoviruses. *Virology.* 203, 229-240.
- Grave L, Dreyer D, Dieterle A, Leroy P, Michou AI, Doderer C, Pavirani A, Lusky M and Mehtali M.** (2000). Differential influence of the E4 adenoviral genes on viral and cellular promoters. *J Gene Med.* 2, 433-443.
- Groitel P and Dobner T.** (2007). Construction of adenovirus type 5 early region 1 and 4 virus mutants. *Methods Mol Med.* 130, 29-39.
- Gustafsson B, Huang W, Bogdanovic G, Gauffin F, Nordgren A, Talekar G, Ornelles DA and Gooding LR.** (2007). Adenovirus DNA is detected at increased frequency in Guthrie cards from children who develop acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer.* 97, 992-4.
- Halbert DN, Cutt JR and Shenk T.** (1985). Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *J Virol.* 56, 250-257.
- Hall PA, Kearsey JM, Coates PJ, Norman DG, Warbrick E and Cox LS.** (1995). Characterisation of the interaction between PCNA and Gadd45. *Oncogene.* 10, 2427-33.
- Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R and et al.** (1990). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol.* 162, 285-94.
- Hanahan D and Meselson M.** (1983). Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol.* 100, 333-42.
- Harada JN, Shevchenko A, Pallas DC and Berk AJ.** (2002). Analysis of the adenovirus E1B-55K-anchored proteome reveals its link to ubiquitination machinery. *J Virol.* 76, 9194-9206.
- Harlow E, Franza BR, Jr. and Schley C.** (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 Lane D.** (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory: New York, pp 139-318.
- Härtl B, Zeller T, Blanchette P, Kremmer E and Dobner T.** (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.

- Hasan S and Hottiger MO.** (2002). Histone acetyl transferases: a role in DNA repair and DNA replication. *J Mol Med.* 80, 463-74.
- Hasan S, Stucki M, Hassa PO, Imhof R, Gehrig P, Hunziker P, Hubscher U and Hottiger MO.** (2001). Regulation of human flap endonuclease-1 activity by acetylation through the transcriptional coactivator p300. *Mol Cell.* 7, 1221-31.
- Hayflick L.** (1968). Human cells and aging. *Sci Am.* 218, 32-7.
- He T-C, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW and Vogelstein B.** (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95, 2509-2514.
- Helin K and Harlow E.** (1994). Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 is required for binding to the adenovirus E4 (ORF6/7) protein. *J Virol.* 68, 5027-5035.
- Henderson BR and Eleftheriou A.** (2000). A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export signals. *Exp Cell Res.* 256, 213-224.
- Herisse J, Rigolet M, de Dinechin SD and Galibert F.** (1981). Nucleotide sequence of adenovirus 2 DNA fragment encoding for the carboxylic region of the fiber protein and the entire E4 region. *Nucl Acids Res.* 9, 4023-4042.
- Hershko A and Ciechanover A.** (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 67, 425-79.
- Hilleman MR and Werner JH.** (1954). Recovery of new agents from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med.* 85, 183-188.
- Hoegge C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G and Jentsch S.** (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature.* 419, 135-41.
- Hoppe A, Beech SJ, Dimmock J and Leppard KN.** (2006). Interaction of the adenovirus type 5 E4 Orf3 protein with promyelocytic leukemia protein isoform II is required for ND10 disruption. *J Virol.* 80, 3042-9.
- Horwitz MS.** (1996). *Virology*, Vol. 2. Fields Bn, Knipe Dm and Howley Pm (eds). Lippincott-Raven: New York, pp 2149-2171.
- Horwitz MS.** (2001). Adenovirus immunoregulatory genes and their cellular targets. *Virology.* 279, 1-8.
- Houweling A, van den Elsen PJ and van der Eb AJ.** (1980). Partial transformation of primary rat cells by the leftmost 4.5% fragment of adenovirus 5 DNA. *Virology.* 105, 537-550.
- Huang MM and Hearing P.** (1989). Adenovirus early region 4 encodes two gene products with redundant effects in lytic infection. *J Virol.* 63, 2605-2615.
- Huebner RJ, Rowe WP, Ward TG, Parrot RH and Bell JA.** (1954). Adenoidal-pharyngeal conjunctival agents. *N Engl J Med.* 251, 1077-1086.
- Hutton FG, Turnell AS, Gallimore PH and Grand RJ.** (2000). Consequences of disruption of

- the interaction between p53 and the larger adenovirus early region 1B protein in adenovirus E1 transformed human cells. *Oncogene*. 19, 452-462.
- Ibelgaufts H, Jones KW, Maitland N and Shaw JF.** (1982). Adenovirus-related RNA sequences in human neurogenic tumours. *Acta Neuropathol Berl.* 56, 113-117.
- Jakoby WB, and I.H. Pastan.** (1979). Cell culture. Methods in enzymology. *Academic press, Inc., San Diego, Carlifornia.*
- Javier RT, Raska K, Jr., Macdonald GJ and Shenk T.** (1991). Human adenovirus type 9-induced rat mammary tumors. *J Virol.* 65, 3192-3202.
- Javier RT, Raska K, Jr. and Shenk T.** (1992). Requirement for the adenovirus type 9 E4 region in production of mammary tumors. *Science.* 257, 1267-1271.
- Johnston SA and Hopper JE.** (1982). Isolation of the yeast regulatory gene GAL4 and analysis of its dosage effects on the galactose/melibiose regulon. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79, 6971-5.
- Jonsson N and Ankerst J.** (1977). Studies on adenovirus type 9-induced mammary fibroadenomas in rats and their malignant transformation. *Cancer.* 39, 2513-2519.
- Kanopka A, Muhlemann O, Petersen-Mahrt S, Estmer C, Ohrmalm C and Akusjärvi G.** (1998). Regulation of adenovirus alternative RNA splicing by dephosphorylation of SR proteins. *Nature.* 393, 185-187.
- Karuppayil SM, Moran E and Das GM.** (1998). Differential regulation of p53-dependent and -independent proliferating cell nuclear antigen gene transcription by 12 S E1A oncoprotein requires CBP. *J Biol Chem.* 273, 17303-6.
- Ketner G, Bridge E, Virtanen A, Hemstrom C and Pettersson U.** (1989). Complementation of adenovirus E4 mutants by transient expression of E4 cDNA and deletion plasmids. *Nucl Acids Res.* 17, 3037-3048.
- Kindsmüller K, Groitl P, Härtl B, Blanchette P, Hauber J and Dobner T.** (2007). Intranuclear targeting and nuclear export of the adenovirus E1B-55K protein are regulated by SUMO1 conjugation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104, 6684-6689.
- Kindsmüller K, Schreiner S, Leinenkugel F, Groitl P, Kremmer E and Dobner T.** (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.
- Kleinberger T.** (2000). Induction of apoptosis by adenovirus E4orf4 protein. *Apoptosis.* 5, 211-215.
- Kleinberger T and Shenk T.** (1993). Adenovirus E4orf4 protein binds to protein phosphatase 2A, and the complex down regulates E1A-enhanced junB transcription. *J Virol.* 67, 7556-7560.
- Kochanek S.** (1999). High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy. *Hum Gene Ther.* 10, 2451-2459.

- König C, Roth J and Dobbelstein M.** (1999). Adenovirus type 5 E4orf3 protein relieves p53 inhibition by E1B-55-kilodalton protein. *J Virol.* 73, 2253-2262.
- Kosulin K, Haberler C, Hainfellner JA, Amann G, Lang S and Lion T.** (2007). Investigation of adenovirus occurrence in pediatric tumor entities. *J Virol.* 81, 7629-35.
- Koundrioukoff S, Jonsson ZO, Hasan S, de Jong RN, van der Vliet PC, Hottiger MO and Hubscher U.** (2000). A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cdk2 targets PCNA-interacting proteins for phosphorylation. *J Biol Chem.* 275, 22882-7.
- Koyuncu O.** (2009). Role of the Adenovirus Type 5 L4-100K Protein During Lytic Infection. *PhD Thesis, University of Hamburg.*
- Kuhlmann I, Achten S, Rudolph R and Dörfler W.** (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.
- Kuwano K, Kawasaki M, Kunitake R, Hagimoto N, Nomoto Y, Matsuba T, Nakanishi Y and Hara N.** (1997a). Detection of group C adenovirus DNA in small-cell lung cancer with the nested polymerase chain reaction. *J Cancer Res Clin Oncol.* 123, 377-382.
- Kuwano K, Nomoto Y, Kunitake R, Hagimoto N, Matsuba T, Nakanishi Y and Hara N.** (1997b). Detection of adenovirus E1A DNA in pulmonary fibrosis using nested polymerase chain reaction. *Eur Respir J.* 10, 1445-1449.
- Kzhyshkowska J, Kremmer E, Hofmann M, Wolf H and Dobner T.** (2004). Protein arginine methylation during lytic adenovirus infection. *Biochem J.* 383, 259-265.
- Laemmli UK.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-5.
- Lavoie JN, Champagne C, Gingras MC and Robert A.** (2000). Adenovirus E4 open reading frame 4-induced apoptosis involves dysregulation of Src family kinases. *J Cell Biol.* 150, 1037-1056.
- Lavoie JN, Nguyen M, Marcellus RC, Branton PE and Shore GC.** (1998). E4orf4, a novel adenovirus death factor that induces p53-independent apoptosis by a pathway that is not inhibited by zVAD-fmk. *J Cell Biol.* 140, 637-645.
- Lawler M, Humphries P, O'Farrelly C, Hoey H, Sheils O, Jeffers M, O'Briain DS and Kelleher D.** (1994). Adenovirus 12 E1A gene detection by polymerase chain reaction in both the normal and coeliac duodenum. *Gut.* 35, 1226-1232.
- Lee SS, Weiss RS and Javier RT.** (1997). Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94, 6670-6675.
- Leppard KN, Emmott E, Cortese MS and Rich T.** (2009). Adenovirus type 5 E4 Orf3 protein targets promyelocytic leukaemia (PML) protein nuclear domains for disruption via a sequence in PML isoform II that is predicted as a protein interaction site by bioinformatic

- analysis. *J Gen Virol.* 90, 95-104.
- Leppard KN and Shenk T.** (1989). The adenovirus E1B 55 kd protein influences mRNA transport via an intranuclear effect on RNA metabolism. *EMBO J.* 8, 2329-2336.
- Liebermann H, Mentel R, Dohner L, Modrow S and Seidel W.** (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.
- Limb GA, Salt TE, Munro PM, Moss SE and Khaw PT.** (2002). In vitro characterization of a spontaneously immortalized human Muller cell line (MIO-M1). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43, 864-9.
- Liu Y, Shevchenko A, Shevchenko A and Berk AJ.** (2005). Adenovirus exploits the cellular aggresome response to accelerate inactivation of the MRN complex. *J Virol.* 79, 14004-16.
- Lorz M, Meyer-Breiting E and Bettinger R.** (1994). Proliferating cell nuclear antigen counts as markers of cell proliferation in head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 251, 91-4.
- Lucas T.** (2005). In-vitro und In-vivo-Untersuchungen funktioneller Bereiche des Adenovirus Typ 5 E4orf3-Proteins. *Dissertation, Universität Regensburg.*
- Lupold SE and Rodriguez R.** (2005). Adenoviral gene therapy, radiation, and prostate cancer. *Rev Urol.* 7, 193-202.
- Lusky M, Christ M, Rittner K, Dieterle A, Dreyer D, Mourot B, Schultz H, Stoeckel F, Pavirani A and Mehtali M.** (1998). In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J Virol.* 72, 2022-2032.
- Mackey JK, Green M, Wold WSM and Ridgen P.** (1979). Analysis of human cancer DNA for DNA sequences of human adenovirus type 4. *J Natl Cancer Inst.* 62, 23-26.
- Mackey JK, Rigden PM and Green M.** (1976). Do highly oncogenic group A human adenoviruses cause human cancer? Analysis of human tumors for adenovirus 12 transforming DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA.* 73, 4657-4661.
- Maitland NJ, Kinross JH, Busuttill A, Ludgate SM, Smart GE and Jones KW.** (1981). The detection of DNA tumour virus-specific RNA sequences in abnormal human cervical biopsies by in situ hybridization. *J Gen Virol.* 55, 123-137.
- Maizel JV, Jr., White DO and Scharff MD.** (1968). The polypeptides of adenovirus. II. Soluble proteins, cores, top components and the structure of the virion. *Virology.* 36, 126-36.
- Mannervik M, Fan S, Ström AC, Helin K and Akusjärvi G.** (1999). Adenovirus E4 open reading frame 4-induced dephosphorylation inhibits E1A activation of the E2 promoter and E2F-1-mediated transactivation independently of the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Virology.* 256, 313-321.
- Marcellus RC, Chan H, Paquette D, Thirlwell SW, Boivin D and Branton PE.** (2000). Induction of p53-independent apoptosis by the adenovirus E4orf4 protein requires binding to the Balph subunit of protein phosphatase 2A. *J Virol.* 74, 7869-7877.

- Marcellus RC, Lavoie JN, Boivin D, Shore GC, Ketner G and Branton PE.** (1998). The early region 4 orf4 protein of human adenovirus type 5 induces p53-independent cell death by apoptosis. *J Virol.* 72, 7144-7153.
- Marcellus RC, Teodoro JG, Charbonneau R, Shore GC and Branton PE.** (1996). Expression of p53 in Saos-2 osteosarcoma cells induces apoptosis which can be inhibited by Bcl-2 or the adenovirus E1B-55 kDa protein. *Cell Growth Differ.* 7, 1643-1650.
- Marton MJ, Baim SB, Ornelles DA and Shenk T.** (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.
- Marty L and Fort P.** (1996). A delayed-early response nuclear gene encoding MRPL12, the mitochondrial homologue to the bacterial translational regulator L7/L12 protein. *J Biol Chem.* 271, 11468-76.
- Mathews MB and Shenk T.** (1991). Adenovirus virus-associated RNA and translation control. *J Virol.* 65, 5657-5662.
- Mathias P, Wickham T, Moore M and Nemerow G.** (1994). Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. *J Virol.* 68, 6811-4.
- McAlear MA, Howell EA, Espenshade KK and Holm C.** (1994). Proliferating cell nuclear antigen (p130) mutations suppress cdc44 mutations and identify potential regions of interaction between the two encoded proteins. *Mol Cell Biol.* 14, 4390-7.
- McLorie W, McGlade CJ, Takayesu D and Branton PE.** (1991). Individual adenovirus E1B proteins induce transformation independently but by additive pathways. *J Gen Virol.* 72, 1467-1471.
- Medghalchi S, Padmanabhan R and Ketner G.** (1997). Early region 4 modulates adenovirus DNA replication by two genetically separable mechanisms. *Virology.* 236, 8-17.
- Miron MJ, Blanchette P, Groitl P, Dallaire F, Teodoro JG, Li S, Dobner T and Branton PE.** (2009). Localization and importance of the adenovirus E4orf4 protein during lytic infection. *J Virol.* 83, 1689-99.
- Miron MJ, Gallouzi IE, Lavoie JN and Branton PE.** (2004). Nuclear localization of the adenovirus E4orf4 protein is mediated through an arginine-rich motif and correlates with cell death. *Oncogene.* 23, 7458-68.
- Mitrus I, Missol-Kolka E, Plucienniczak A and Szala S.** (2005). Tumour therapy with genes encoding apoptin and E4orf4. *Anticancer Res.* 25, 1087-90.
- Mitsudomi T, Steinberg SM, Nau MM, Carbone D, D'Amico D, Bodner HK, Oie HK, Linnoila RI, Mulshine JL, Minna JD and Gazdar AF.** (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.
- Modrow S and Falke D.** (2002). *Molekulare Virologie (2. Auflage)*. Spektrum Akademischer

---

---

Verlag: Heidelberg.

- Moldovan GL, Pfander B and Jentsch S.** (2007). PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*. 129, 665-79.
- Moller A and Schmitz ML.** (2003). Viruses as hijackers of PML nuclear bodies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 51, 295-300.
- Moore M, Horikoshi N and Shenk T.** (1996). Oncogenic potential of the adenovirus E4orf6 protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93, 11295-11301.
- Nevels M.** (1999). Oncogenes Potential des E4orf6- und E4orf3-Proteins von Adenovirus Typ 5. *Dissertation. Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene*
- Nevels M, Rubenwolf S, Spruss T, Wolf H and Dobner T.** (1997). 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, Rubenwolf S, Spruss T, Wolf H and Dobner T.** (2000). Two distinct activities contribute to the oncogenic potential of the adenovirus type 5 E4orf6 protein. *J Virol*. 74, 5168-5181.
- Nevels M, Spruss T, Wolf H and Dobner T.** (1999a). The adenovirus E4orf6 protein contributes to malignant transformation by antagonizing E1A-induced accumulation of the tumor suppressor protein p53. *Oncogene*. 18, 9-17.
- Nevels M, Täuber B, Kremmer E, Spruss T, Wolf H and Dobner T.** (1999b). Transforming potential of the adenovirus type 5 E4orf3 protein. *J Virol*. 73, 1591-1600.
- Nevels M, Täuber B, Spruss T, Wolf H and Dobner T.** (2001). "Hit-and-run" transformation by adenovirus oncogenes. *J Virol*. 75, 3089-3094.
- Nicolás AL, Munz PL, Falck-Pedersen E and Young CSH.** (2000). Creation and repair of specific DNA double-strand breaks *in vivo* following infection with adenovirus vectors expressing *Saccharomyces cerevisiae* HO endonuclease. *Virology*. 266, 211-224.
- Nilsson CE, Petersen-Mahrt S, Durot C, Shtrichman R, Krainer AR, Kleinberger T and Akusjärvi G.** (2001). The adenovirus E4-ORF4 splicing enhancer protein interacts with a subset of phosphorylated SR proteins. *EMBO J*. 20, 864-871.
- Nordqvist K and Akusjärvi G.** (1990). Adenovirus early region 4 stimulates mRNA accumulation via 5' introns. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87, 9543-9547.
- Nordqvist K, Öhman K and Akusjärvi G.** (1994). Human adenovirus encodes two proteins which have opposite effects on accumulation of alternatively spliced mRNAs. *Mol Cell Biol*. 14, 437-445.
- O'Connor RJ and Hearing P.** (2000). The E4-6/7 protein functionally compensates for the loss of E1A expression in adenovirus infection. *J Virol*. 74, 5819-5824.
- O'Neal WK, Zhou H, Morral N, Aguilar Cordova E, Pestaner J, Langston C, Mull B, Wang**

- Y, Beaudet AL and Lee B.** (1998). Toxicological comparison of E2a-deleted and first-generation adenoviral vectors expressing alpha1-antitrypsin after systemic delivery. *Hum Gene Ther.* 9, 1587-1598.
- O'Shea C, Klupsch K, Choi S, Bagus B, Soria C, Shen J, McCormick F and Stokoe D.** (2005a). Adenoviral proteins mimic nutrient/growth signals to activate the mTOR pathway for viral replication. *EMBO J.*
- O'Shea CC, Johnson L, Bagus B, Choi S, Nicholas C, Shen A, Boyle L, Pandey K, Soria C, Kunich J, Shen Y, Habets G, Ginzinger D and McCormick F.** (2004). Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity. *Cancer Cell.* 6, 611-623.
- O'Shea CC, Soria C, Bagus B and McCormick F.** (2005b). Heat shock phenocopies E1B-55K late functions and selectively sensitizes refractory tumor cells to ONYX-015 oncolytic viral therapy. *Cancer Cell.* 8, 61-74.
- Öhman K, Nordquist K, Linder S and Akusjärvi G.** (1995). Effect of adenovirus-2 early region 4 products on E1 transformation. *International Journal of Oncology.* 6, 663-668.
- Orlando JS and Ornelles DA.** (1999). An arginine-faced amphipathic alpha helix is required for adenovirus type 5 E4orf6 protein function. *J Virol.* 73, 4600-4610.
- Orlando JS and Ornelles DA.** (2002). E4orf6 Variants with Separate Abilities To Augment Adenovirus Replication and Direct Nuclear Localization of the E1B 55-Kilodalton Protein. *J Virol.* 76, 1475-1487.
- Paraskeva C, Brown KW, Dunn AR and Gallimore PH.** (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 Gallimore PH.** (1980). Tumorigenicity and in vitro characteristics of rat liver epithelial cells and their adenovirus-transformed derivatives. *Int J Cancer.* 25, 631-639.
- Pfander B, Moldovan GL, Sacher M, Hoege C and Jentsch S.** (2005). SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature.* 436, 428-33.
- Pfeffer A, Schubert R, Orend G, Hilger-Eversheim K and Doerfler W.** (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.
- Pilder S, Moore M, Logan J and Shenk T.** (1986). The adenovirus E1B-55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs. *Mol Cell Biol.* 6, 470-476.
- Pollard VW and Malim MH.** (1998). The HIV-1 rev protein. *Annu Rev Microbiol.* 52, 491-532.
- Prelich G and Stillman B.** (1988). Coordinated leading and lagging strand synthesis during SV40 DNA replication in vitro requires PCNA. *Cell.* 53, 117-26.

- Puntervoll P, Linding R, Gemund C, Chabanis-Davidson S, Mattingsdal M, Cameron S, Martin DM, Ausiello G, Brannetti B, Costantini A, Ferre F, Maselli V, Via A, Cesareni G, Diella F, Superti-Furga G, Wyrwicz L, Ramu C, McGuigan C, Gudavalli R, Letunic I, Bork P, Rychlewski L, Kuster B, Helmer-Citterich M, Hunter WN, Aasland R and Gibson TJ.** (2003). ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. *Nucleic Acids Res.* 31, 3625-30.
- Querido E, Blanchette P, Yan Q, Kamura T, Morrison M, Boivin D, Kaelin WG, Conaway RC, Conaway JW and Branton PE.** (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, Marcellus RC, Lai A, Charbonneau R, Teodoro JG, Ketner G and Branton PE.** (1997). Regulation of p53 levels by the E1B 55-kilodalton protein and E4orf6 in adenovirus-infected cells. *J Virol.* 71, 3788-98.
- Rafii S, Dias S, Meeus S, Hattori K, Ramachandran R, Feuerback F, Worgall S, Hackett NR and Crystal RG.** (2001). Infection of endothelium with E1(-)E4(+), but not E1(-)E4(-), adenovirus gene transfer vectors enhances leukocyte adhesion and migration by modulation of ICAM-1, VCAM-1, CD34, and chemokine expression. *Circ Res.* 88, 903-910.
- Raska K, Jr. and Gallimore PH.** (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.
- Reich NC, Sarnow P, Duprey E and Levine AJ.** (1983). Monoclonal antibodies which recognize native and denatured forms of the adenovirus DNA-binding protein. *Virology.* 128, 480-484.
- Ridgway PJ, Hall AR, Myers CJ and Braithwaite AW.** (1997). p53/E1b58kDa complex regulates adenovirus replication. *Virology.* 237, 404-413.
- Robert A, Miron MJ, Champagne C, Gingras MC, Branton PE and Lavoie JN.** (2002). Distinct cell death pathways triggered by the adenovirus early region 4 ORF 4 protein. *J Cell Biol.* 158, 519-28.
- Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrot RH and Ward TG.** (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med.* 84, 570-573.
- Russel WC.** (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol.* 81, 2573-2604.
- Russell WC.** (2009). Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol.* 90, 1-20.
- Russell WC and Matthews DA.** (2003). Nuclear perturbations following adenovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* 272, 399-413.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239, 487-91.

- Sambrook J, E.F. Fritsch, and T. Maniatis.** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.*
- Sarnow P, Ho YS, Williams J and Levine AJ.** (1982a). Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell.* 28, 387-394.
- Sarnow P, Sullivan CA and Levine AJ.** (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, 510-517.
- Schaley J, O'Connor RJ, Taylor LJ, Bar-Sagi D and Hearing P.** (2000). Induction of the cellular E2F-1 promoter by the adenovirus E4-6/7 protein. *J Virol.* 74, 2084-2093.
- Schiedner G, Hertel S and Kochanek S.** (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 RC and Schimke RT.** (1996). Preparation of electrocompetent E. coli using salt-free growth medium. *Biotechniques.* 20, 42-4.
- Shenk T.** (2001). *Virology, Vol. 2.* Knipe Dm and Howley Pm (eds). Lippincott-Raven: New York, pp 2265-2300.
- Shenk T and Flint J.** (1991). Transcriptional and transforming activities of the adenovirus E1A proteins. *Adv Cancer Res.* 57, 47-85.
- Shepard RN and Ornelles DA.** (2003). E4orf3 is necessary for enhanced S-phase replication of cell cycle-restricted subgroup C adenoviruses. *J Virol.* 77, 8593-8595.
- Shepard RN and Ornelles DA.** (2004). Diverse roles for E4orf3 at late times of infection revealed in an E1B 55-kilodalton protein mutant background. *J Virol.* 78, 9924-9935.
- Shiroki K, Hashimoto S, Saito I, Fukui Y, Kato H and Shimojo H.** (1984). Expression of the E4 gene is required for establishment of soft-agar colony-forming rat cell lines transformed by the adenovirus 12 E1 gene. *J Virol.* 50, 854-863.
- Shtrichman R and Kleinberger T.** (1998). Adenovirus type 5 E4 open reading frame 4 protein induces apoptosis in transformed cells. *J Virol.* 72, 2975-2982.
- Shtrichman R, Sharf R, Barr H, Dobner T and Kleinberger T.** (1999). Induction of apoptosis by adenovirus E4-open-reading-frame-4 protein is specific to transformed cells and requires an interaction with protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96, 10080-10085.
- Shtrichman R, Sharf R and Kleinberger T.** (2000). Adenovirus E4orf4 protein interacts with both Balpha and B' subunits of protein phosphatase 2A, but E4orf4-induced apoptosis is mediated only by the interaction with Balpha. *Oncogene.* 19, 3757-3765.
- Sieber T and Dobner T.** (2007). Adenovirus type 5 early region 1B 156R protein promotes cell transformation independently of repression of p53-stimulated transcription. *J Virol.* 81,

95-105.

- Silver PA.** (1991). How proteins enter the nucleus. *Cell*. 64, 489-97.
- Speiseder T.** (2006). Herstellung und Charakterisierung von E4orf3- und E4orf6-defekten Virusmutanten von Adenovirus Serotyp 5. *Diplomarbeit, Universität Regensburg*.
- Steegenga WT, Riteco N, Jochemsen AG, Fallaux FJ and Bos JL.** (1998). The large E1B protein together with the E4orf6 protein target p53 for active degradation in adenovirus infected cells. *Oncogene*. 16, 349-357.
- Stracker TH, Carson CT and Weitzman MD.** (2002). Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11 Rad50 NBS1 DNA repair complex. *Nature*. 418, 348-352.
- Stryer L.** (1999). Biochemie. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg*. 1. korrigierter Nachdruck der 4. Auflage.
- Täuber B.** (1998). Vergleich transformierender Eigenschaften der E4orf3- und E4orf6-Proteine von Adenovirus Typ 5. *Diplomarbeit, Universität Regensburg*.
- Täuber B and Dobner T.** (2001a). Adenovirus early E4 genes in viral oncogenesis. *Oncogene*. 20, 7847-7854.
- Täuber B and Dobner T.** (2001b). Molecular regulation and biological function of adenovirus early genes: the E4 ORFs. *Gene*. 278, 1-23.
- Teodoro JG, Shore GC and Branton PE.** (1995). Adenovirus E1A proteins induce apoptosis by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene*. 11, 467-474.
- Thomas DL, Schaack J, Vogel H and Javier RT.** (2001). Several E4 region functions influence mammary tumorigenesis by human adenovirus type 9. *J Virol*. 75, 557-568.
- Thomas DL, Shin S, Jiang BH, Vogel H, Ross MA, Kaplitt M, Shenk TE and Javier RT.** (1999). Early region 1 transforming functions are dispensable for mammary tumorigenesis by human adenovirus type 9. *J Virol*. 73, 3071-3079.
- Tooze J.** (1981). *Cold Spring Harbor, Vol. 2nd ed.* Cold Spring Harbor Laboratory: New York, pp 943-1054.
- Trentin JJ, Yabe Y and Taylor G.** (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.
- Ullman AJ and Hearing P.** (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 SJL, The SI, Klein B, Jochemsen AG, Zantema A and van der Eb AJ.** (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, Van der Heijdt S and Hoeben RC.** (2005). The adenovirus capsid: major progress

- in minor proteins. *J Gen Virol.* 86, 1581-8.
- Virtanen A, Gilardi P, Naslund A, LeMoullec JM, Pettersson U and Perricaudet M.** (1984). mRNAs from human adenovirus 2 early region 4. *J Virol.* 51, 822-831.
- Vojtesek B, Bartek J, Midgley CA and Lane DP.** (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.
- Wang DM, Zhou Y, Xie HJ, Ma XL, Wang X, Chen H and Huang BR.** (2006). Cytotoxicity of a recombinant fusion protein of adenovirus early region 4 open reading frame 4 (E4orf4) and human epidermal growth factor on p53-deficient tumor cells. *Anticancer Drugs.* 17, 527-37.
- Wang Q, Greenburg G, Bunch D, Farson D and Finer MH.** (1997). Persistent transgene expression in mouse liver following in vivo gene transfer with a delta E1/delta E4 adenovirus vector. *Gene Ther.* 4, 393-400.
- Warbrick E.** (1998). PCNA binding through a conserved motif. *Bioessays.* 20, 195-9.
- Watts FZ.** (2006). Sumoylation of PCNA: Wrestling with recombination at stalled replication forks. *DNA Repair (Amst).* 5, 399-403.
- Weber K, Bartsch U, Stocking C and Fehse B.** (2008). A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol Ther.* 16, 698-706.
- Weiden MD and Ginsberg HS.** (1994). Deletion of the E4 region of the genome produces adenovirus DNA concatemers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91, 153-157.
- Weigel S and Dobbelstein M.** (2000). The nuclear export signal within the E4orf6 protein of adenovirus type 5 supports virus replication and cytoplasmic accumulation of viral mRNA. *J Virol.* 74, 764-772.
- Weinberg DH and Ketner G.** (1983). A cell line that supports the growth of a defective early region 4 deletion mutant of human adenovirus type 2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80, 5383-5386.
- Weinberg DH and Ketner G.** (1986). Adenoviral early region 4 is required for efficient viral DNA replication and for late gene expression. *J Virol.* 57, 833-838.
- Weiss RS and Javier RT.** (1997). A carboxy-terminal region required by the adenovirus type 9 E4 ORF1 oncoprotein for transformation mediates direct binding to cellular polypeptides. *J Virol.* 71, 7873-7880.
- Whalen SG, Marcellus RC, Whalen A, Ahn NG, Ricciardi RP and Branton PE.** (1997). Phosphorylation within the transactivation domain of adenovirus E1A protein by mitogen-activated protein kinase regulates expression of early region 4. *J Virol.* 71, 3545-3553.

- 
- 
- 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 JL, Byrd PJ, Grand RJ and Gallimore PH.** (1984). Isolation and characterization of four adenovirus type 12-transformed human embryo kidney cell lines. *Mol Cell Biol.* 4, 110-116.
- Wickham TJ, Filardo EJ, Cheresch DA and Nemerow GR.** (1994). Integrin alpha v beta 5 selectively promotes adenovirus mediated cell membrane permeabilization. *J Cell Biol.* 127, 257-64.
- Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA and Nemerow GR.** (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell.* 73, 309-19.
- Williams J, Williams M, Liu C and Telling G.** (1995). Assessing the role of E1A in the differential oncogenicity of group A and group C human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 199, 149-175.
- Wold WS, Mackey JK, Rigden P and Green M.** (1979). Analysis of human cancer DNA's for DNA sequence of human adenovirus serotypes 3, 7, 11, 14, 16, and 21 in group B1. *Cancer Res.* 39, 3479-84.
- Yamano S, Tokino T, Yasuda M, Kaneuchi M, Takahashi M, Niitsu Y, Fujinaga K and Yamashita T.** (1999). Induction of transformation and p53-dependent apoptosis by adenovirus type 5 E4orf6/7 cDNA. *J Virol.* 73, 10095-10103.
- Yaniv M.** (1979). Construction of hybrid viruses in vitro and their possible use for the production of specific viral or cellular proteins. *Dev Biol Stand.* 42, 87-91.
- Zalmanzon ES.** (1987). Transforming and oncogenic properties of the adenovirus genome. *Eksp Onkol.* 9, 3-8.
- Zhong S, Hu P, Ye TZ, Stan R, Ellis NA and Pandolfi PP.** (1999). A role for PML and the nuclear body in genomic stability. *Oncogene.* 18, 7941-7947.
- Zinchuk V and Zinchuk O.** (2008). Quantitative colocalization analysis of confocal fluorescence microscopy images. *Curr Protoc Cell Biol.* Chapter 4, Unit 4 19.

# Veröffentlichungen

---

---

## Publikationen in Fachzeitschriften

Blanchette P, Kindsmuller K, Groitl P, Dallaire F, Speiseder T, Branton PE and Dobner T. (2008). Control of mRNA export by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins during productive infection requires E4orf6 ubiquitin ligase activity. *J Virol.* 82, 2642-51.

## Vorträge auf Fachtagungen

Speiseder T. "The adenovirus E4 proteins – multifunctional regulators of virus and cell growth."  
*Annual Retreat Virus-Host Interaction, Heinrich-Pette Institut, Hamburg, 07. Dezember 2007.*

Speiseder T., Groitl P., Dobner T. "Human adenovirus E4 region orf3/4 protein is required for efficient virus replication."  
*Adenovirus Workshop, Hamburg, 11. - 13. Februar 2009.*

## Posterpräsentationen bei Fachtagungen

Speiseder T., Groitl P., Dobner T. "Analyses of human adenovirus type 5 E4orf3 and E4orf6 functions in productive infection."  
*Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Erlangen, 01. - 05. September 2007*

Speiseder T., Groitl P., Dobner T. "Human adenovirus E4 region orf3/4 protein is required for efficient virus replication."  
*Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Leipzig, 18. – 21. März 2009*

Speiseder T., Groitl P., Dobner T. "Human adenovirus E4 region orf3/4 protein is required for efficient virus replication."  
*Small DNA Tumor Viruses Meeting, Oxford, 14. – 19. Juli 2009*

## Teilnahme an Fachtagungen

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

*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 Betreuung meiner Doktorarbeit sowie für die Möglichkeit mit ihm nach Hamburg ans Heinrich-Pette-Institut zu kommen. Seine tatkräftige Unterstützung und sein Engagement für dieses trickreiche Projekt 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. Michael Böttger für den Vorsitz der Prüfungskommission, bei den Disputationsgutachtern und den Fragestellern bedanken.*

*Bei Herrn PD Dr. Michael Winkler bedanke ich mich herzlich für seine Hilfe und Unterstützung bei der Interaktionssuche im Y2H-System.*

*Meinen beiden Kollegen aus dem Dungeon danke ich für die gute Zusammenarbeit, das Korrekturlesen und die hilfreichen Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Darüberhinaus danke ich Peter für sein stetes Bemühen mir jegliche Stresssituation zu simulieren um mich gegen äussere Einflüsse abzuhärten, sowie über die zahlreichen guten Gespräche aus denen oft wundervolle Diskussionen hervorgingen. Bei Sabri möchte ich mich für ihre Unterstützung, Motivation und lustige Abende bedanken.*

*Dem "Grand Cloneur" danke ich für seine Hilfe und wertvollen Ratschläge für die Klonierung der Virusmutanten. Danke Peter, dass ich von Dir so viel lernen durfte!*

*Meinen Kollegen aus der Gruppe danke ich für die nette Zusammenarbeit durch die ich viele Male mein technisches Verständnis für Laborgeräte erweitern konnte.*

*Meinen Eltern und meiner Familie danke ich unabhängig von allen Höhen und Tiefen ohne deren Unterstützung und Verständnis diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Seht diese Arbeit als Entschädigung, dass ich mich so selten blicken hab lassen.*