

# Untersuchungen zur Funktion des humanen Adenovirus Typ 5 E4orf6 Proteins

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften

des Fachbereichs Biologie,  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,  
der



vorgelegt von

Daniela Müller  
aus Fürth

Hamburg 2011

Genehmigt vom Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Prof. Dr. T. DOBNER  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Prof. Dr. W. BRUNE  
Tag der Disputation: 15. Juli 2011

Hamburg, den 30. Juni 2011

A. Temming

Professor Dr. Axel Temming  
Leiter des Fachbereichs Biologie

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1 Adenoviren	3
1.1.1 Klassifikation	3
1.1.2 Klinische Relevanz humaner Adenoviren	4
1.1.3 Struktur und Genomorganisation	4
1.1.4 Produktiver Infektionszyklus	6
1.1.5 Funktionen von E4orf6 während der adenoviralen Infektion	7
1.2 Virale Onkogenese	10
1.2.1 Transformation und Onkogenität humaner Adenoviren	10
1.2.2 Funktion adenoviraler Onkoproteine	11
1.3 Funktionen von Homeobox Proteinen	15
1.3.1 Funktionen von HoxB7	17
1.4 Zusammensetzung und Funktion der subzellulären PML-NBs	18
1.5 Aufgabenstellung	20
<b>2 Material</b>	<b>22</b>
2.1 Zellen	22
2.1.1 Bakterienstämme	22
2.1.2 Hefestämme	22
2.1.3 Säugerzelllinien	22
2.2 Adenoviren	23
2.3 Nukleinsäuren	24
2.3.1 Oligonukleotide	24
2.3.2 Expressionsvektoren	25
2.3.3 Rekombinante Plasmide	25
2.4 Antikörper	27
2.4.1 Primärantikörper	27
2.4.2 Sekundärantikörper	28

---

2.5	Kommerzielle Systeme . . . . .	29
2.6	Enzyme, Reagenzien und Verbrauchsmaterial . . . . .	29
2.7	Größen- und Molekulargewichtstandards . . . . .	29
2.8	Versuchstiere . . . . .	29
2.9	Software und Datenbanken . . . . .	29
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>31</b>
3.1	Bakterien . . . . .	31
3.1.1	Kulturbedingungen und Lagerung . . . . .	31
3.1.2	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen . . . . .	31
3.1.3	Chemische Transformation von <i>E. coli</i> . . . . .	32
3.2	Hefe-Zwei-Hybrid-System . . . . .	32
3.2.1	Screening einer B-Zell cDNA Bibliothek . . . . .	33
3.2.2	Transformation von Hefezellen . . . . .	33
3.2.3	$\beta$ -Galaktosidase Test . . . . .	35
3.3	Säugerzellen . . . . .	35
3.3.1	Kultivierung von etablierten Zelllinien . . . . .	35
3.3.2	Lagerung von Säugerzellen . . . . .	36
3.3.3	Bestimmung der Gesamtzellzahl . . . . .	36
3.3.4	Transfektion von Säugerzellen . . . . .	36
3.3.5	Ernte von Säugerzellen . . . . .	37
3.3.6	Gewinnung und Kultivierung von primären Rattennierenzellen . . . . .	37
3.3.7	Transformation primärer Rattennierenzellen . . . . .	38
3.3.8	Herstellung stabiler <i>knock down</i> Zelllinien . . . . .	38
3.4	Lentiviren . . . . .	39
3.4.1	Herstellung und Lagerung rekombinanter lentiviraler Partikel . . . . .	39
3.4.2	Titration von Lentiviren . . . . .	40
3.4.3	Transduktion von Säugerzellen . . . . .	40
3.5	Adenoviren . . . . .	41
3.5.1	Herstellung von Viruspartikeln aus DNA . . . . .	41
3.5.2	Herstellung und Lagerung hochtitriger Virusstocks . . . . .	41
3.5.3	Titerbestimmung von Virusstocks . . . . .	41
3.5.4	Infektion von Säugerzellen mit Adenoviren . . . . .	42
3.5.5	Bestimmung der Ausbeute an Virusnachkommen . . . . .	43
3.6	DNA Techniken . . . . .	43
3.6.1	Präparation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> . . . . .	43
3.6.2	Präparation von Plasmid DNA aus Hefezellen . . . . .	44
3.6.3	Präparation von genomischer DNA aus Säugerzellen . . . . .	44
3.6.4	Konzentrationsbestimmung von DNA . . . . .	44

---

3.6.5	DNA-Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	45
3.6.6	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen . . . . .	45
3.6.7	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) . . . . .	45
3.6.8	Klonierung von DNA-Fragmenten . . . . .	47
3.7	RNA Techniken . . . . .	48
3.7.1	Vermeidung RNase induzierten RNA Abbaus . . . . .	48
3.7.2	Präparation von RNA aus Säugerzellen . . . . .	49
3.7.3	Konzentrationsbestimmung von RNA . . . . .	49
3.7.4	Quantitative <i>Real Time</i> PCR zur Ermittlung der mRNA Syntheserate . . . . .	49
3.8	Protein Techniken . . . . .	49
3.8.1	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> . . . . .	49
3.8.2	<i>In vitro</i> Translation . . . . .	50
3.8.3	Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Säugerzellen . . . . .	51
3.8.4	Quantitative Bestimmung von Proteinkonzentrationen . . . . .	51
3.8.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	52
3.8.6	<i>Western Blot</i> . . . . .	52
3.8.7	Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen . . . . .	54
3.8.8	Nachweis von Protein-Protein Interaktionen . . . . .	54
3.8.9	Nachweis von Protein-DNA Interaktionen . . . . .	56
3.9	Immunfluoreszenz-Analysen . . . . .	58
3.9.1	Fixierung mit Methanol . . . . .	58
3.9.2	Immunologischer Nachweis . . . . .	58
3.10	Lumineszenz-basierte Reporterversuche . . . . .	58
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>60</b>
4.1	Untersuchung zur Funktion des C-Terminus von E4orf6 im Kontext der viralen Replikation	60
4.1.1	Herstellung der Virusmutanten H5pm4182 und H5pm4229 . . . . .	61
4.1.2	Charakterisierung der Virusmutanten H5pm4182 und H5pm4229 . . . . .	62
4.2	Identifizierung von HoxB7 als Interaktionspartner der E4orf6 Onkodomäne . . . . .	75
4.3	Analysen zur Interaktion von HoxB7 mit E4orf6 . . . . .	77
4.3.1	E4orf6 interagiert mit HoxB7 <i>in vitro</i> . . . . .	77
4.3.2	E4orf6 interagiert mit HoxB7 in transient transfizierten Zellen . . . . .	78
4.3.3	E4orf6 interagiert mit endogenem HoxB7 in infizierten Zellen . . . . .	80
4.3.4	Identifizierung der HoxB7 Binderegion im E4orf6 Protein . . . . .	82
4.4	Analyse der Rolle von HoxB7 bei der Transformation durch adenovirale Genprodukte	84
4.5	Analysen zur Rolle von HoxB7 im produktiven viralen Replikationszyklus . . . . .	85
4.5.1	Herstellung und Charakterisierung einer HoxB7 negativen humanen Zelllinie .	85
4.5.2	HoxB7 ist ein positiver Regulator der viralen Replikation . . . . .	87
4.5.3	HoxB7 beeinflusst die Transkription von viralen Promotoren . . . . .	96

---

4.5.4	E4orf6 reguliert die HoxB7-abhängige und -unabhängige Transkription . . . . .	98
4.5.5	Interaktion von HoxB7 mit den viralen Transkriptionsregulatoren E1A, E2A und E4orf6/7 . . . . .	101
4.6	Veränderte Expression von HoxB7 im Verlauf des viralen Infektionszyklus . . . . .	104
4.7	Analysen zur Interaktion von PML mit E4orf6 . . . . .	106
4.7.1	Identifizierung der Binderegion von PML im E4orf6 Protein . . . . .	107
4.8	Analyse der Rolle von PML bei der Transformation durch adenovirale Genprodukte .	112
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>113</b>
5.1	Die Onkodomäne des E4orf6 Proteins ist für die produktive Infektion nicht ausreichend	113
5.2	HoxB7 ist ein neuer zellulärer Interaktionspartner von E4orf6 . . . . .	117
5.3	HoxB7 interagiert mit weiteren viralen Proteinen . . . . .	120
5.4	Veränderte HoxB7 Expression in der Adenovirusinfektion . . . . .	121
5.5	HoxB7 ist ein positiver Regulator der viralen Replikation . . . . .	123
5.6	E4orf6 als potentieller Transkriptionsregulator . . . . .	128
5.7	Einfluss von HoxB7 und PML in der Adenovirus-vermittelten Transformation . . . . .	129
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>132</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>155</b>

---

# Abkürzungsverzeichnis

<b>Zeichen:</b>	<b>Bedeutung:</b>
AdV	Adenovirus
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäurerest
Bp	Basenpaar(e)
BRK	Rattennierenzellen ( <i>baby rat kidney cells</i> )
CAR	Coxsackie B Virus und Adenovirus Rezeptor
cDNA	<i>copy</i> Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol Dihydrochlorid
DBP	DNA-bindendes Protein ( <i>dna binding protein</i> ) des Adenovirus
DEPC	Diethylpyrocarbonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E1-E4	frühe Region 1 bis 4 ( <i>early region</i> ) des Adenovirus
EBV	Epstein-Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EtOH	Ethanol
ELISA	<i>Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay</i>
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
ffu	Fluoreszenz-bildende Einheit(en) ( <i>fluorescence forming unit(s)</i> )
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
fw	<i>forward</i>
H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub>	zweifach destilliertes Wasser
HA	Hämagglutinin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus
h p.i.	Stunden nach Infektionsbeginn ( <i>hours post infection</i> )
h p.t.	Stunden nach Transfektion ( <i>hours post transfection</i> )
HBV	Hepatitis B Virus
(H)CMV	(Humanes) Cytomegalie Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HPV	Humanes Papillomvirus
HSV	Herpes-Simplex Virus
HTLV	Humanes T-lymphotropes Virus
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IgG <sub>H,L</sub>	schwere, leichte Kette des Immunglobulin G
ITR	invertierte Sequenzwiederholungen ( <i>inverted terminal repeat</i> )
kBp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
KSHV	Kaposi´s Sarcoma Virus
LB	Luria-Bertani

---

L1-L5	späte Region 1 bis 5 ( <i>late region</i> ) des Adenovirus
MCPyV	Merkel-Zell-Polyomavirus
MLTU	<i>major late transcription unit</i>
moi	Multiplizität der Infektion ( <i>multiplicity of infection</i> )
mRNA	messenger RNA
MTOC	<i>microtubule organizing center</i>
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NES	nukleäres Exportsignal
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
nt	Nukleotid(e)
OD	optische Dichte
orf	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pRb	Retinoblastom-Tumorsuppressorprotein
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SV40	Simian-Virus Typ-40
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TP	Terminales Protein
TPL	<i>tripartite leader</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
U	Unit
UKE	Universitäts-Klinikum Eppendorf
UpM	Umdrehungen pro Minute
VA RNAs	Virus-assoziierte RNAs
Vol.	Volumen
v/v	Volumenanteil pro Gesamtvolumen ( <i>volume per volume</i> )
w/v	Gewichtsanteil pro Gesamtvolumen ( <i>weight per volume</i> )
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid

---

# Zusammenfassung

Das humane Adenovirus Typ 5 gilt als Modellsystem zur Analyse der Funktionen viraler Onkoproteine bei der Zelltransformation. Hierbei vermitteln Proteine der E1-Region (E1A und E1B) entscheidende Schritte im Transformationsprozess wie die Initiierung der Zellzyklusprogression und Inaktivierung antiproliferativer Mechanismen der Wirtszelle. Aber auch Genprodukte der E4-Region (E4orf3 und E4orf6) sind durch ihre Interaktionen mit unterschiedlichen zellulären Faktoren in wichtige zelluläre Mechanismen wie DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle und Apoptose involviert und tragen hierdurch zur Transformation bei. Kooperierend mit den Proteinen der E1-Region sind beide E4-Proteine in der Lage, die Transformation zu verstärken, wobei die transformierten Zellen Charakteristika einer vollständigen onkogenen Transformation zeigen. Im E4orf6 Protein wurde der C-Terminus, die Onkodomäne, hierfür als ausreichend befunden.

Da die Funktionen der viralen Proteine in der Transformation und in der Virusinfektion eng miteinander verknüpft sind, war es von Interesse, den Einfluss dieser Domäne des E4orf6 Proteins in der Virusinfektion zu untersuchen. Hierfür wurden Virusmutanten, die nur diesen Teil des E4orf6 Proteins enthalten, hergestellt und charakterisiert. Die Ergebnisse zeigen, dass der C-Terminus von E4orf6, die Onkodomäne, nicht ausreichend ist, die verschiedenen Aufgaben von E4orf6 in einer produktiven Virusinfektion zu erfüllen. Besonders der Verlust der Fähigkeit, zusammen mit E1B-55K und zellulären Proteinen eine E3-Ubiquitin-Ligase zu assemblieren, durch die Substrate wie p53 und Mre11 dem proteasomalen Abbau zugeführt werden können, ist hierfür vermutlich entscheidend. Jedoch auch der von der Ligasefunktion abhängige Export viraler mRNAs, für den E4orf6 und E1B-55K entscheidend sind, spielt möglicherweise eine Rolle. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, kommt es bei der Infektion mit den neu generierten Virusmutanten zu einer deutlich reduzierten Synthese später Strukturproteine und einer ineffizienten Produktion viraler Partikel.

Das E4orf6 Protein ist für die produktive Infektion sehr wichtig und spielt eine Rolle auf allen Ebenen der Genexpression. Dabei besitzt es sowohl E1B-55K abhängige als auch -unabhängige Funktionen. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine bisher unbekannte Funktion dieses Proteins bei der Regulation der Transkription viraler Promotoren hin. Dafür spricht die Interaktion mit dem zellulären Transkriptionsfaktor HoxB7. Dieses Genprodukt wurde in der vorliegenden Arbeit als neuer Interaktionspartner von E4orf6, aber auch von E1A, E2A und E4orf6/7 identifiziert. Scheinbar aktiviert das Protein in der frühen Phase der Infektion die Transkription der frühen viralen Promotoren und ist damit ein positiver Faktor für eine effiziente Virusinfektion. Durch die Interaktionen mit den unterschiedlichen viralen Proteinen im

---

Verlauf der Infektion wird diese Aktivität möglicherweise reguliert. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Fehlen von HoxB7 eine verringerte Aktivität der viralen Promotoren, besonders von E1A und E2, induziert. Als Folge hiervon sind auch die Mengen früher viraler mRNAs sowie früher und später viraler Proteine reduziert und eine effiziente Produktion infektiöser Virusnachkommen ist nicht mehr möglich.

Auch die Transformation durch adenovirale Onkogene scheint, wie die Ergebnisse der Arbeit zeigen, von HoxB7 beeinflusst zu werden. Die durch das E4orf6 Protein verursachte verstärkte Transformation kann allerdings nicht durch die Interaktion von HoxB7 mit dem viralen Protein erklärt werden. Möglicherweise spielt hier die Interaktion von E4orf6 mit PML eine entscheidendere Rolle. Wie in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden konnte, interagiert das zelluläre Protein mit der Onkodomäne von E4orf6 und Mutationen in dem potentiellen Interaktionsbereich verringern die Zahl transformierter Zellen. Im Ganzen deuten die Ergebnisse eine Rolle dieser Faktoren bei der Adenovirus-vermittelten Transformation an und bilden die Grundlage für weiterführende Studien zur Aufklärung der viralen Onkogenese.

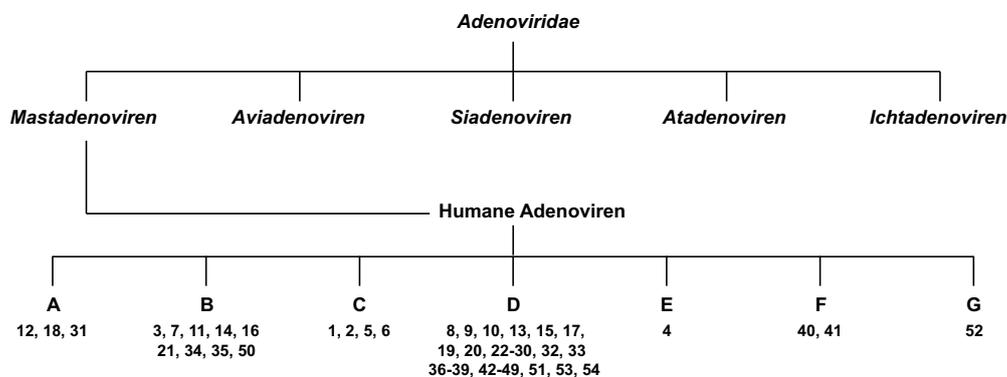
---

# 1 Einleitung

## 1.1 Adenoviren

### 1.1.1 Klassifikation

Adenoviren (AdV) wurden 1953 erstmalig aus adenoidem Gewebe und dem Rachensekret respiratorisch erkrankter Personen isoliert (Rowe *et al.*, 1953; Hilleman und Werner, 1954). Nachdem die Charakterisierung der Pathogene dieser zwei Isolate große Ähnlichkeiten aufzeigte, wurden sie derselben Virusfamilie zugeordnet, die nach dem Gewebe des ersten Auffindens benannt wurde (Enders *et al.*, 1956). Seither sind in allen Wirbeltierklassen mehr als 100 serologisch unterscheidbare Vertreter dieser Virusfamilie nachgewiesen und den fünf Gattungen, den *Mastadenoviren* der Säugetiere, den *Aviadenoviren* der Vögel, den *Siadenoviren* von Reptilien und Vögeln und den *Atadenoviren* von Reptilien, Vögeln und Säugetieren zugeordnet worden. Für die neu vorgeschlagene Gruppe der *Ichtadenoviren* konnte bisher ein Vertreter in Stören gefunden werden (Bailey und Mautner, 1994; Benko, 2000; Davison *et al.*, 2003). Zur Gattung der *Mastadenoviren* gehören die humanen Adenoviren, von denen bis heute 54 verschiedene Virustypen nachgewiesen werden konnten. Anhand von Sequenzhomologie, Hämagglutination und der Onkogenität in immunsupprimierten Nagetieren werden diese Typen den sieben Spezies A bis G zugeordnet (Abb. 1.1) (Wadell, 1984; Bailey und Mautner, 1994; Davison *et al.*, 2003).



**Abbildung 1.1:** Klassifikation der *Adenoviridae*. Dargestellt sind die fünf Gattungen der *Adenoviridae*. Die zur Gattung der *Mastadenoviren* gehörenden humanen Adenoviren zählen 54 Virustypen, die in die Spezies A bis G unterteilt sind (nach Davison *et al.*, 2003).

### 1.1.2 Klinische Relevanz humaner Adenoviren

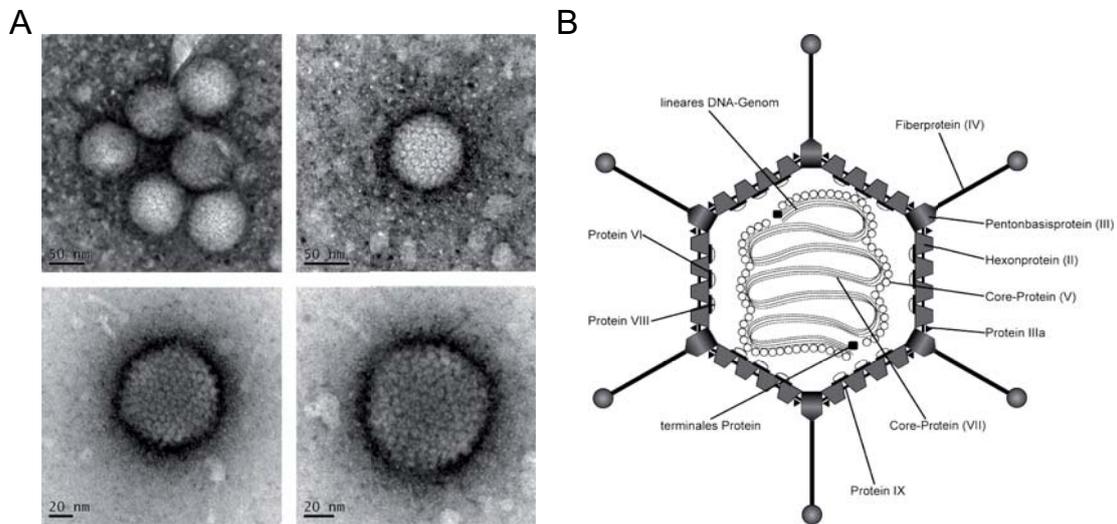
Die Entdeckung der Adenoviren erfolgte durch Studien, in denen nach den ethiologischen Agenzien von respiratorischen Erkrankungen gesucht worden ist (Rowe *et al.*, 1953; Hilleman und Werner, 1954). Neben respiratorischen Erkrankungen sind diese Viren allerdings mit weiteren klinischen Symptomen, wie Appendizitis (Subgruppe A, E), Gastroenteritis (Subgruppe G), Keratokonjunktivitis (Subgruppe A, D, E) oder Pharyngitis (Subgruppe A, E) assoziiert. Darüber hinaus können aber auch andere Organe wie Blase, Leber oder Herz befallen werden und es kommt zu persistierenden Harnwegsinfektionen (Subgruppe B), Zystitis (Subgruppe A, B, E), Hepatitis und Meningoenzephalitis (Subgruppe B) (Russel, 2000; Wold und Horwitz, 2007). Infektionen mit Adenoviren treten meist im frühen Kindesalter auf und können bei immunkompetenten Menschen gut von deren Immunsystem unschädlich gemacht werden. Die Prävalenz von Adenoviren in der Bevölkerung und damit die Langzeitimmunität ist sehr hoch, was im Hinblick auf die Verwendung adenoviraler Vektoren in der Gentherapie von Nachteil ist. Bei Neugeborenen oder immunsupprimierten Patienten, etwa bei AIDS-Patienten oder nach Knochenmarkstransplantationen, kann es dagegen zu schwerwiegenden Infektionen mit lethalem Verlauf kommen (Abe *et al.*, 2003; Wold und Horwitz, 2007). Neben diesen, seit längerem bekannten, Krankheitsbildern wird seit kurzem auch Fettleibigkeit beim Menschen mit einer Infektion durch das HAdV36 in Verbindung gebracht (Atkinson *et al.*, 2005).

Adenoviren verursachen in der Regel lytische Infektionen, allerdings kommt es auch zur Etablierung von persistierenden Infektionen in den Wirtszellen. In den T-Lymphozyten der Tonsillen von Kindern konnten sowohl für frühe als auch späte virale Proteine kodierende Genabschnitte gefunden werden (Garnett *et al.*, 2009), weshalb angenommen wird, dass das gesamte virale Genom in diesen Zellen persistiert. Ob die virale DNA hier aber in episomaler Form vorliegt, wie dies bei einer akuten Infektion der Fall ist, ist bislang noch unklar. Weiterhin ist nicht bekannt, ob die frühen und späten viralen Genprodukte exprimiert werden oder nicht. Neben den Tonsillen wurde virale DNA auch in Lungenepithelzellen gefunden, hier erfolgte auch die Expression von E1A-Proteinen lange nach der eigentlichen Infektion (Elliott *et al.*, 1995). Eine Persistenz von Adenoviren wird weiterhin im Zentralnervensystem, im Großhirn und der Ependymschicht (Kosulin *et al.*, 2007) sowie im Gastrointestinaltrakt (Allard *et al.*, 1992; McLaughlin *et al.*, 2003) vermutet. Besonders letzt Genanntes ist bezüglich einer Reaktivierung in immunsupprimierten Patienten von großer Bedeutung. Ein Mechanismus für eine solche Reaktivierung ist bislang allerdings nicht bekannt.

### 1.1.3 Struktur und Genomorganisation

Adenoviren besitzen ikosaedrische, etwa 80-110 nm große Partikel, welche nicht von einer Membran umhüllt sind (Rux und Burnett, 2004; San Martin und Burnett, 2003). Hauptbestandteile dieses Proteinkapsids sind 240 Hexontrimere sowie 12 Pentonproteine. Diese, an den Ecken des Kapsid liegenden, Pentonproteine werden von Fiberproteinen gebunden (Ginsberg *et al.*, 1966), was den Viruspartikeln ihr charakteristisches Aussehen verleiht (Abb.1.2). Weitere Komponenten des Kapsid sind die Proteine IIIa, VI, VIII und IX (Vellinga *et al.*, 2005).

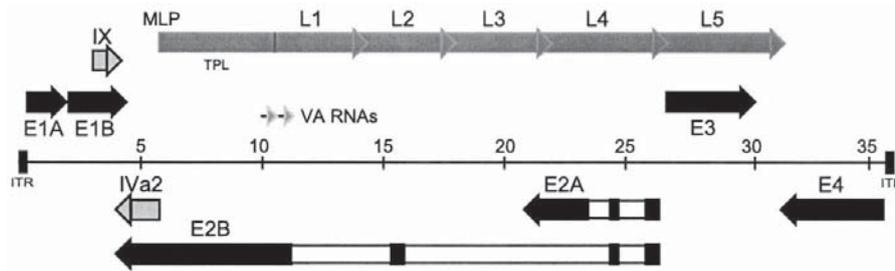
Neben dem Schutz des darin enthaltenen Genoms, spielt das Kapsid, besonders das Fiber- und Pentonprotein, bei der Virusadsorption und dem Eintritt in den Wirtsorganismus eine entscheidende Rolle (Bergelson *et al.*, 1997; Wickham *et al.*, 1994).



**Abbildung 1.2: Kapsidstruktur von Adenoviren.** A Elektronenmikroskopische Aufnahme von adenoviralen (HA5) Partikeln (Forschungsgruppe Elektronenmikroskopie und Mikrotechnologie, Heinrich-Pette Institut Hamburg). B Schematische Darstellung der Struktur von Adenoviren (aus Modrow und Falke, 2002).

Das adenovirale Genom besteht aus linearer, doppelsträngiger DNA, besitzt invertierte Sequenzwiederholungen an den Enden (ITR, *inverted terminal repeats*) und hat, je nach Virustyp, eine Länge von 26-45 kBp. An den 5' Enden beider DNA Stränge ist zudem das terminale Protein (TP) kovalent gebunden, welches für die Initiation der viralen DNA Replikation essentiell ist (Davison *et al.*, 2003). Neben diesem TP gibt es weitere mit der DNA assoziierte Proteine, wie die Proteine V, VII und  $\mu$ , die vermutlich die DNA kondensieren und diese mit dem Kapsid verbinden (Protein V) (Hosokawa und Sung, 1976; Russell, 2009).

Aufgrund ihrer fehlenden Onkogenität sind die Typen HA2 und HA5 die am besten untersuchten Adenoviren (Shenk, 2001), die Genomorganisation wird daher exemplarisch für HA5 beschrieben. Das adenovirale Genom enthält acht frühe (E1A, E1B, E2<sub>early</sub>, E3, E4, IX, E2<sub>late</sub> und IVa2) sowie eine späte (MLTU, *major late transcription unit*) Transkriptionseinheit(en). Letztere erzeugt mRNAs, die den fünf Familien L1 bis L5 zugeordnet werden. Ausgehend von diesen neun Transkriptionseinheiten werden durch Transkription von der RNA-Polymerase II und anschließendem alternativen Spleißen schließlich etwa 40 verschiedene regulatorische und strukturelle Proteine hervorgebracht. Darüber hinaus trägt das virale Genom zwei Virus-assoziierte RNAs (VA RNAs), die von der RNA-Polymerase III transkribiert werden (Abb. 1.3) (Shenk, 2001).



**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Genomorganisation von HAdV5.** Die Organisation der frühen (E1, E2A, E2B, E3, E4, IVa2 und pIX) und späten Gene (L1 bis L5) sowie der VA RNAs auf den beiden kodierenden DNA Strängen ist durch Pfeile dargestellt. Die Pfeilrichtung gibt dabei die Transkriptionsrichtung an. E, *early*; L, *late*; MLP, *major late promoter*; TPL, *tripartite leader*; VA RNAs, *virus-associated RNAs*; ITR, *inverted terminal repeat* (aus Täuber und Dobner, 2001).

#### 1.1.4 Produktiver Infektionszyklus

Wenngleich Adenoviren verschiedene Zelltypen infizieren können, sind ihre bevorzugten Zielzellen postmitotisch ruhende, terminal differenzierte Epithelzellen des Hals-, Nasen- und Rachenraumes, der Lunge und des Gastrointestinaltraktes. In der Zellkultur können dagegen eine Reihe weiterer primärer wie auch Tumorzellen lytisch infiziert werden.

Der produktive Replikationszyklus wird aufgeteilt in eine frühe und eine späte Phase, wobei die frühe Phase den Zeitraum bis zum Einsetzen der viralen DNA Replikation und die späte Phase die Zeit danach bezeichnet.

Die primäre Adsorption der viralen Partikel an der Wirtszelle erfolgt durch ihre antennenartigen Fortsätze, die Fiberproteine (Lonberg-Holm und Philipson, 1969), an den Rezeptor CAR (Coxsackie B Virus und Adenovirus Rezeptor) (Bergelson *et al.*, 1997; Tomko *et al.*, 1997). Darauf folgt die Bindung von Pentonproteinen an zelluläre Integrine (Nemerow und Stewart, 1999), was schließlich die Endozytose der Viruspartikel stimuliert. Die aufgenommenen Viruspartikel werden zum Zellkern transportiert, wo sie mit dem Kernporenkomplex interagieren und der virale DNA-Komplex in den Zellkern eingeschleust wird (Dales und Charbonnet, 1973; Greber *et al.*, 1997). Hier erfolgt die Synthese des ersten viralen Genproduktes, des E1A Proteins, welches die Transkription der anderen frühen viralen Gene (E1B bis E4) induziert (Nevins *et al.*, 1979; Ricciardi *et al.*, 1981; Berk, 1986). Diese frühen Genprodukte sind regulatorische Proteine, die optimale Bedingungen für die Virusinfektion schaffen. Zum einen ist dies der Eintritt von ruhenden Zellen in die S-Phase und die Induktion der Zellzyklusprogression (E1, E4), weiterhin die Modulation der Immunantwort des Wirtsorganismus (E3), zum anderen die Blockierung von antiviralen Mechanismen der Wirtszelle (E1, E4) (Jones und Shenk, 1979; Wold *et al.*, 1999; Horwitz, 2001; Berk, 2005). Sobald die E2 Proteine, die DNA-Polymerase, das terminale Protein (TP) und das DNA-bindende Protein (DBP), in ausreichendem Maße synthetisiert worden sind, beginnt die virale DNA-Replikation und damit auch die späte Phase der Infektion. Ausgehend von der späten Transkriptionseinheit, der MLTU, entsteht eine 29 kbp lange Vorläufer-RNA, die differentiell gespleißt wird und die etwa 15 späten viralen mRNAs (L1 bis L5) hervorbringt. Diesen viralen mRNAs ist ein 201 nt lan-

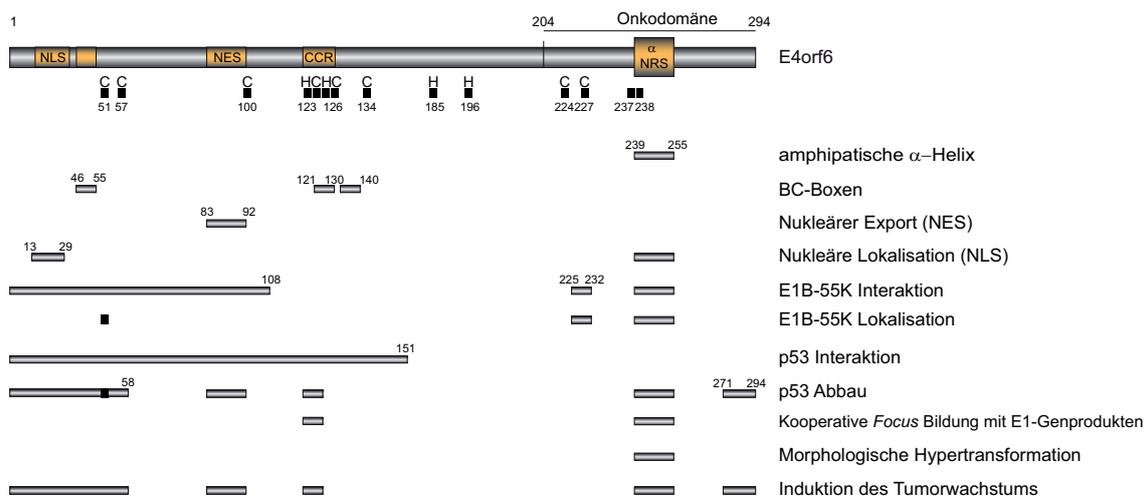
ger 5' nicht-Kodierungsbereich (*tripartite leader*, TPL) gemein und sie kodieren hauptsächlich für die späten viralen Strukturproteine (Abb. 1.3) (Shenk, 2001). Weitere, für die späte Phase der Infektion charakteristische, Ereignisse sind das Abschalten der zellulären Proteinsynthese (*host shut-off*), wobei die viralen Proteine weiterhin effizient hergestellt werden können und die Reorganisation des Zellkerns und des Zytoskelettes (Puvion-Dutilleul *et al.*, 1995a; Defer *et al.*, 1990). Zur Assemblierung neuer Viruspartikel werden die späten Strukturproteine sowie die DNA und mit ihr assoziierte Proteine ins Zytoplasma transportiert, in dem der Zusammenbau erfolgt. Der Infektionszyklus endet in der Gewebekultur, je nach Zelltyp, nach etwa 24 h mit der Lyse der Wirtszelle und der Freisetzung von ca. 10.000 Viruspartikeln (Shenk, 2001).

### 1.1.5 Funktionen von E4orf6 während der adenoviralen Infektion

Das E4orf6 Protein ist ein 294 Aminosäuren großes Genprodukt der frühen E4-Region und wurde in den vergangenen 20 Jahren mit großem Interesse analysiert, da verschiedene Studien zeigen konnten, dass nur Mutationen in diesem E4-Protein einen signifikanten Effekt auf die Virusreplikation haben (Halbert *et al.*, 1985). Die Funktionen dieses multifunktionalen Proteins sind sehr komplex und wirken auf allen Ebenen der Genexpression, wobei die Proteinfunktionen während der Virusinfektion teilweise mit den onkogenen Eigenschaften von E4orf6 überlappen (vgl. 1.2.2.2). So konnte gezeigt werden, dass dieses frühe virale Protein für die maximale Produktion von neuen Viren von großer Wichtigkeit ist, da es das Spleißen der späten viralen mRNAs (Öhman *et al.*, 1993; Nordqvist *et al.*, 1994), deren Transport ins Zytoplasma (Halbert *et al.*, 1985; Weinberg und Ketner, 1986; Beltz und Flint, 1979), die virale DNA-Synthese (Medghalchi *et al.*, 1997), den *host cell shut-off* und die Inhibierung der Apoptose beeinflusst (Täuber und Dobner, 2001). Das E4orf6 sowie das E4orf3 Protein können unabhängig voneinander die unprozessierte virale RNA im Nukleus stabilisieren, wobei beide zwar teilweise redundante aber nicht identische Funktionen besitzen (Imperiale *et al.*, 1995). Diese Funktion könnte mit der Regulation des Spleißens der späten mRNA verknüpft sein, bei der beide Proteine eine Rolle spielen (Öhman *et al.*, 1993; Nordqvist *et al.*, 1994). Weiterhin besitzen diese frühen viralen Proteine die Fähigkeit, die Effizienz der viralen DNA Synthese durch einen bisher unbekanntem Mechanismus zu beeinflussen (Medghalchi *et al.*, 1997). Hierbei wird spekuliert, dass möglicherweise das Fehlen der viralen Proteine einen Effekt auf die Expression früher Gene und damit wiederum negative Auswirkungen auf die DNA Synthese hat (Leppard, 1997).

Für andere für die lytische Infektion wichtige E4orf6 Funktionen ist dessen Interaktion mit E1B-55K von Bedeutung. Es wurde gezeigt, dass der Komplex dieser beiden viralen Proteine die späte virale Genexpression posttranskriptionell beeinflusst, indem er den Export späterer viralen mRNAs ins Zytoplasma fördert und gleichzeitig die meisten zellulären mRNAs im Zellkern zurückhält (Babiss *et al.*, 1985; Halbert *et al.*, 1985; Pilder *et al.*, 1986; Cutt *et al.*, 1987; Huang und Hearing, 1989; Bridge und Ketner, 1990). Der genaue Mechanismus ist unbekannt, aber verschiedene Modelle hierfür wurden vorgeschlagen. So könnten beide Proteine den Transport direkt vermitteln, da sowohl der E1B-55K-E4orf6 Komplex als auch

E4orf6 zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma pendeln können (Dobbelstein *et al.*, 1997; Goodrum *et al.*, 1996; Fischer *et al.*, 1999). Der Export von E4orf6 wird dabei durch eine Leucin-reiche nukleäre Exportsequenz (NES) des HIV-1 Rev-Typs vermittelt (Dobbelstein *et al.*, 1997; Weigel und Dobbelstein, 2000), während eine Sequenz im C-Terminus des Proteins, die eine amphipatische  $\alpha$ -Helix formt, ein Kernlokalisierungssignal (NLS, *nuclear localisation signal* bzw. NRS, *nuclear retention signal*) enthält (Orlando und Ornelles, 1999) (vgl. Abb. 1.4). Darüber hinaus gibt es im N-Terminus ein weiteres, putatives NLS (Nevels *et al.*, 2000). Die amphipatische  $\alpha$ -Helix wurde als ausreichend befunden, E1B-55K in den Zellkern zu dirigieren und dort zu halten (Dobbelstein *et al.*, 1997; Orlando und Ornelles, 1999, 2002; Marshall *et al.*, 2008).



**Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Struktur von HAdV5 E4orf6.** Dargestellt sind wichtige funktionelle Bereiche des Proteins. Eine genauere Erklärung ist dem Text zu entnehmen. BC-Box: Elongin B / Elongin C-Box, CCR: konservierte Cystein / Histidin-reiche Region, NES: *nuclear export signal*, NLS: *nuclear localisation signal*, NRS: *nuclear retention signal*. (nach Nevels *et al.*, 2000; Täuber und Dobner, 2001).

Neben der E1B-55K Lokalisation konnte die  $\alpha$ -Helix, bei der es sich vermutlich um eine echte eigenständige Proteindomäne handelt, für weitere durch E4orf6 vermittelte Funktionen als ausreichend identifiziert werden (Nevels *et al.*, 2000). Dennoch wird die Rolle der nukleozytoplasmatischen Pendelaktivität von E4orf6 bei dem Transport später viraler mRNAs bis heute kontrovers diskutiert (Rabino *et al.*, 2000; Weigel und Dobbelstein, 2000; Higashino *et al.*, 2005). Da der Transport der späten viralen mRNAs von der zellulären proteasomalen Abbaumaschinerie abhängt, ist auch denkbar, dass dieser Transportprozess von einer, im Folgenden beschriebenen, E1B-55K-E4orf6 Ligase abhängt (Corbin-Lickfett und Bridge, 2003; Woo und Berk, 2007; Blanchette *et al.*, 2008). Vermutlich beruht die Interaktion von E4orf6 und E1B-55K auf der Assemblierung eines Multiproteinkomplexes, der Ubiquitin-Ligase Funktionen besitzt und auf posttranslationaler Ebene wirkt. Dabei assemblieren die beiden viralen Proteine zusammen mit den zellulären Komponenten Cullin 5, Rbx 1 und Elongin B und C einen SCF-ähnlichen E3-Ubiquitin-Ligase Komplex, der zelluläre Substrate polyubiquitiniert und damit dem proteasomalen Abbau zuführt. Hierbei ermöglicht E4orf6 durch seine BC-Boxen (vgl. 1.1.5) den Zusammenbau des Komplexes, während E1B-55K die zellulären

Proteinsubstrate rekrutiert. Bislang konnten p53, Mre11, die DNA-Ligase IV, Integrin  $\alpha 3$ , die Bloom Helikase und Daxx als Substrate identifiziert werden, wobei der Abbau von Daxx vermutlich E4orf6 unabhängig erfolgt (Baker *et al.*, 2007; Blanchette *et al.*, 2004, 2008; Dallaire *et al.*, 2009a,b; Harada *et al.*, 2002; Querido *et al.*, 1997, 2001a,b; Steegenga *et al.*, 1998; Stracker *et al.*, 2002; Orazio *et al.*, 2011; Schreiner *et al.*, 2010). Der Abbau dieser zellulären Substrate ist für eine effiziente lytische Infektion wichtig, da die Inaktivierung von Mre11 und der DNA-Ligase die Konkatemisierung der viralen DNA verhindert (Weiden und Ginsberg, 1994). Dies wird durch die Fähigkeit von E4orf6, die DNA-Proteinkinase (DNA-PK) zu binden und zu inaktivieren unterstützt (Boyer *et al.*, 1999). Da die durch E1A induzierte p53 Stabilisierung den Zellzyklusarrest oder eine verfrühte Apoptose nach sich zieht, ist der Abbau dieses zellulären Proteins für die Infektion ebenfalls entscheidend. Doch auch unabhängig von E1B-55K ist E4orf6 in der Lage, p53 und das verwandte Protein p73 zu binden und deren transkriptionelle Aktivierung zu hemmen (Dobner *et al.*, 1996; Higashino *et al.*, 1998; Nevels *et al.*, 1997; Grifman *et al.*, 1999; Querido *et al.*, 2001b).

Die für die Interaktion mit E1B-55K verantwortliche Region im E4orf6 Protein wurde in verschiedenen Studien unterschiedlichen Bereichen zugeschrieben. So wird sowohl der C-Terminus, die Onkodomäne (Weigel und Dobbstein, 2000), als auch der N-Terminus (Rubenwolf *et al.*, 1997) für diese Interaktion verantwortlich gemacht. Die Gründe für diese Diskrepanzen sind bislang unklar, werden aber meist mit unterschiedlichen experimentellen Bedingungen oder Veränderungen der Tertiärstruktur des Proteins durch die Deletion oder den Austausch von Aminosäuren begründet (Brown *et al.*, 2001).

Obwohl es bisher keine Kristallstrukturanalyse des E4orf6 Proteins gibt, ist die mit Hilfe von Computermodellen ermittelte vermutete Struktur ein TIM-Barrel sowie eine flexible N-terminale Region (Brown *et al.*, 2001). Entsprechend diesem Modell sowie weiteren Untersuchungen, enthält das Protein eine Reihe konservierte Cystein und Histidin Reste, die möglicherweise für die Bindung von Zinkatomen und damit die E4orf6 Proteinfunktionen wichtig sind (Boyer und Ketner, 2000).

Das E4orf6 Gen aller humanen Adenoviren der verschiedenen Spezies liegt an derselben Stelle des viralen Genoms und die Aminosäuresequenz der Genprodukte weist eine Übereinstimmung von 47-59% auf (Täuber und Dobner, 2001), was die Wichtigkeit dieses viralen Proteins unterstreicht.

Durch alternatives Spleißen entsteht ein weiteres, dem E4orf6 ähnliches Protein, das E4orf6/7 Protein. Dieses Genprodukt teilt mit dem E4orf6 Protein die ersten 58 Aminosäuren, hat aber einen alternativen C-Terminus. Funktionell unterscheidet sich dieses Protein allerdings vom E4orf6 Protein, da es als viraler Transaktivator teilweise die Funktionen von E1A komplementieren kann. Hierfür ist aber nicht der N-Terminus, sondern der diesem Protein eigene C-Terminus verantwortlich (Cress und Nevins, 1996a; Neill und Nevins, 1991).

## 1.2 Virale Onkogenese

Seitdem zu Beginn des 20. Jahrhunderts erstmals Viren mit der Entstehung von Tumoren in Verbindung gebracht wurden (Rous, 1911; Shope und Hurst, 1933; Bittner, 1936), sind bislang zahlreiche Tumoviren identifiziert worden. Anfang der 1960er Jahre wurden erstmals auch humane Viren, darunter Adenoviren, mit malignen Erkrankungen assoziiert (Trentin *et al.*, 1962; Epstein *et al.*, 1965). Zu den heute bekannten Viren, die mit Krebsentstehung im Menschen in Verbindung gebracht werden, gehören das Humane T-lymphotrophe Virus 1 (HTLV-1) (Poiesz *et al.*, 1980; Hinuma *et al.*, 1981), die Humanen Papillomviren (HPV) (Gissmann *et al.*, 1984; Boshart *et al.*, 1984; zur Hausen *et al.*, 1974), das Hepatitis B Virus (HBV) (Blumberg *et al.*, 1975; Szmuness, 1978), das Hepatitis C Virus (HCV) (Colombo *et al.*, 1989; Choo *et al.*, 1989; Alter *et al.*, 1989), das Merkel-Zell-Polyomavirus (MCPyV) (Feng *et al.*, 2007; Shuda *et al.*, 2008) sowie das Epstein-Barr-Virus (EBV) (Epstein *et al.*, 1965) und das Kaposi's Sarcoma Virus (KSHV) (Ganem, 2006). Das tumorigene Potential aller Viren beruht dabei auf der Manipulation wachstumsregulierender zellulärer Faktoren sowie den transformationsfördernden Eigenschaften viraler Onkoproteine (Linzer und Levine, 1979; Vogelstein *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1987; Huebner und Todaro, 1969; Butel, 2000). Neben den hier genannten, gibt es eine Reihe weiterer humaner Viren, bei denen es sich möglicherweise um Tumoviren handeln könnte (McLaughlin-Drubin und Munger, 2008). Hierzu gehören weitere Vertreter der Polyomaviren, aber auch Adenoviren. Ob diese Viren tatsächlich Tumore im Menschen induzieren können, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

### 1.2.1 Transformation und Onkogenität humaner Adenoviren

Die Onkogenität humaner Adenoviren konnte erstmals 1962 im Tiermodell gezeigt werden. Nach Injektion des HAdV12 in neugeborene Hamster, entwickelten die Tiere verschiedene Arten von Tumoren (Trentin *et al.*, 1962). Entsprechend ihres onkogenen Potentials in den Versuchstieren werden humane Adenoviren heute in drei Gruppen eingeteilt (Graham, 1984; Nevins und Vogt, 2007). Die Viren der Spezies A, die in Nagetieren die Bildung von Sarkomen, neuroepithelialen, retinalen und adenomatösen Tumoren induzieren (Graham, 1984; Mukai und Bowers, 1975) und die Virustypen 9 und 10 der Spezies D, die in weiblichen Ratten Mammakarzinome verursachen (Ankerst und Jonsson, 1989; Javier *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 2001), gelten als hoch onkogene Adenoviren. Die Viren der Spezies B werden als schwach onkogen betrachtet, da sie nur unregelmäßig und nach langer Inkubationszeit Tumore in Nagetieren induzieren (Graham, 1984), während den Adenoviren der Spezies C kein onkogenes Potential in Versuchstieren zugesprochen wird. Für die Spezies E, F und G liegen bislang keine genauen Daten hinsichtlich ihres onkogenen Potentials vor.

Unabhängig von ihrer Fähigkeit *in vivo* Tumore zu induzieren, können alle bisher getesteten Adenovirustypen primäre Nagetierzellen *in vitro* transformieren (McBride und Wiener, 1964; Nevins und Vogt, 2007). Die auf diese Weise transformierten Zellen unterscheiden sich jedoch in ihrer Fähigkeit, nach Injektion in Nagetiere, Tumore zu induzieren. Im Gegensatz zu dem onkogenen Potential humaner Adenoviren in Nagetierzellen, ist die Transformation von

humanen Zellen ein sehr seltenes Phänomen (Hahn *et al.*, 1999). Dies hängt möglicherweise damit zusammen, dass Adenoviren in humanen Zellen den vollständigen Replikationszyklus durchlaufen, was schließlich zur Lyse der Zellen führt, während Nagetierzellen nicht permissiv sind und eine produktive Replikation nicht unterstützen. Der Vermutung, dass alleine die Nicht-Permissivität der Grund für die Transformation sein könnte, widerspricht allerdings eine kürzlich durchgeführte Untersuchung, in der das transformierende Potential adenoviraler Proteine in Vertretern der teilweise permissiven Säugetierordnung der *Lagomorpha* aufgedeckt wurde (Wimmer *et al.*, 2010b). Es ist daher anzunehmen, dass eine Reihe weiterer Faktoren die Unterschiede in der Transformierbarkeit bestimmen (Branton *et al.*, 1985; Endter und Dobner, 2004). Trotz der generell nicht auftretenden Transformation humaner Zellen, gelang dies in einigen Fällen *in vitro*. Bei all diesen Ereignissen handelt es sich um die Transformation von embryonalen Zellen nach Transfektion von HAdV12- oder HAdV5-DNA-Fragmenten (Graham *et al.*, 1977; Byrd *et al.*, 1982; Whittaker *et al.*, 1984; Gallimore *et al.*, 1986; Fallaux *et al.*, 1996, 1998; Schiedner *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu diesen *in vitro* Experimenten, konnte ein Einfluss von Adenoviren bei der Entstehung maligner Erkrankungen im Menschen nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden (Mackey *et al.*, 1976, 1979; Wold *et al.*, 1979; Chauvin *et al.*, 1990). Allerdings konnte in einer Untersuchung von kleinzelligen Lungenkarzinomen in einem Drittel der Proben adenovirale DNA der Spezies C detektiert werden (Kuwano *et al.*, 1997) und in mehr als zwei Drittel der Proben verschiedener Hirntumore (Glioblastome, Oligodendrogliome, Ependymome) DNA von Adenoviren der Spezies B, D und C gefunden werden (Kosulin *et al.*, 2007). Zur Aufklärung von Langzeitinfektionen, Persistenz und Tumorinduzierung von Adenoviren müssen demnach weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

### 1.2.2 Funktion adenoviraler Onkoproteine

Die meisten durch Adenoviren induzierten Tumore, Tumorzelllinien und transformierte Zellen sind durch das Vorliegen von persistierender, in das Wirtszellgenom integrierter viraler DNA und der Expression virusspezifischer Antigene charakterisiert (Graham, 1984). Damit folgt die Adenovirus-vermittelte Transformation dem klassischen Konzept der viralen Onkogenese, bei der die ständige Anwesenheit viraler Gene den transformierten Phänotyp aufrecht erhält. Es konnte jedoch in einigen Fällen festgestellt werden, dass die Anwesenheit der adenoviralen Gene nicht zwangsläufig für die Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps nötig ist. Bei diesem „*Hit&Run*“-Modell der viralen Onkogenese ruft die Expression viraler Proteine eine Veränderung in der Zelle hervor („*hit*“), welche auch nach Verlust dieser Onkogene („*run*“) bestehen bleibt (Nevels *et al.*, 2001).

Bei der in den transformierten Zellen gefundenen viralen DNA handelt es sich, je nach Adenovirustyp, um das vollständige Genom oder lediglich um Teile des viralen Chromosoms (Graham, 1984). Allerdings kann in fast allen untersuchten Zellen das linke Ende der viralen DNA, also die E1-Region, nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen und die Tatsache, dass in Zellen in Kultur die Expression von Genen der E1-Region zu onkogener Transformation führt, lassen vermuten, dass diese Genprodukte für die Transformation nötig und ausreichend sind (Branton *et al.*, 1985; van der Eb und Zantema, 1992; Williams *et al.*, 1995; Nevins und Vogt,

1996; Endter und Dobner, 2004). Obwohl die Genprodukte der E1-Region für eine Transformation ausreichend zu sein scheinen (vgl. 1.2.2.1), können Genprodukte der E4-Region diesen Prozess vermutlich unterstützen (vgl. 1.2.2.2) (Öhman *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997, 1999a,b).

### 1.2.2.1 Die E1-Region in der Transformation

Die durch Adenoviren initiierte Transformation ist ein mehrstufiger Prozess, der vom Zusammenspiel verschiedener Genprodukte der E1-Region abhängig ist. Dieser am linken Ende des viralen Genoms gelegene Bereich enthält zwei Transkriptionseinheiten, E1A und E1B, welche bei allen humanen Adenoviren große Ähnlichkeiten zeigen.

Die E1A Transkriptionseinheit kodiert für zwei, durch differentielles Spleißen entstandene, mRNAs (12S und 13S) sowie drei weitere mRNA Spezies (11S, 10S und 9S), die spät im Infektionsverlauf akkumulieren, bislang aber noch keiner Funktion zugeordnet werden konnten (Frisch und Mymryk, 2002; Endter und Dobner, 2004). Die 12S und 13S Proteine sind die wichtigsten Genprodukte und in Transformationsexperimenten ausreichend, primäre Nagetierzellen zu immortalisieren und teilweise zu transformieren (Haley *et al.*, 1984; Moran *et al.*, 1986). Dies beruht auf der Fähigkeit dieser viralen Proteine, das normale Zellwachstum sowie die Immunantwort zu manipulieren, was für die produktive Virusinfektion essentiell ist und in nicht permissiven Nagetierzellen zur Transformation führt. Durch die Interaktion dieser Proteine mit verschiedenen wichtigen regulatorischen Proteinen, darunter Komponenten der Transkriptionsmaschinerie, Transkriptionskoaktivatoren und -repressoren sowie Proteinen, die direkt in die Zellzyklusregulation involviert sind, kommt es zum Eintritt von ruhenden Zellen in die S-Phase und zum Voranschreiten des Zellzyklus (Branton *et al.*, 1985; Endter und Dobner, 2004; Dyson *et al.*, 1989). Zahlreiche Studien zeigen, dass dies auf zwei voneinander unabhängigen, aber möglicherweise synergistisch wirkenden Mechanismen beruht. Zum einen ist dies die Interaktion von E1A mit dem Tumorsuppressor pRB und den verwandten Proteinen p107 und p130, welche deren Dissoziation vom E2F Transkriptionsfaktor bewirkt. Die Freisetzung dieses Transkriptionsfaktors induziert schließlich die Aktivierung von Genen mit E2F-Bindestellen (Cress und Nevins, 1996b). Der zweite Wirkmechanismus umfasst die Interaktion von E1A mit Proteinkomplexen, die die Chromatinstruktur beeinflussen, wie z. B. p300/CBP, P/CAF, TBP, p400, TRAP und damit ebenfalls die Aktivierung von zellulären Genen bewirken (Frisch und Mymryk, 2002; Ferrari *et al.*, 2008, 2009). Zusammen ermöglicht dies den E1A Proteinen, etwa 70% aller Gen-Promotoren auf verschiedene Weise zu beeinflussen (Ferrari *et al.*, 2008, 2009).

Allerdings ist die durch die E1A Proteine hervorgerufene Transformation nicht vollständig, die Zellen erreichen keine hohe Dichte und sind in Versuchstieren kaum tumorigen (Gallimore *et al.*, 1984). Der Grund hierfür ist hauptsächlich, dass als Folge der E1A Funktionen der Tumorsuppressor p53 stabilisiert wird, welcher selbst wiederum Zellzyklusarrest und Apoptose induziert (Debbas und White, 1993; Lowe und Ruley, 1993; Grand *et al.*, 1994; Sabbatini *et al.*, 1995; Mymryk *et al.*, 1994). Der vollständig transformierte Phänotyp benötigt daher die Koexpression von anderen kooperierenden Onkogenen wie z. B. E1B (Ruley, 1983).

Die E1B-Region grenzt an die E1A-Region an und bringt durch differentielles Spleißen mindestens fünf Genprodukte hervor. Neben den beiden wichtigsten Proteinen, dem E1B-55K sowie dem E1B-19K Protein, gibt es drei alternative Spleißvarianten und zwei N-terminal verkürzte E1B-55K Proteine, die zum Teil gleiche Funktionen wie das große E1B-55K Protein zu haben scheinen (Sieber und Dobner, 2007; Kindsmüller *et al.*, 2009).

Entweder E1B-55K oder E1B-19K ist nötig, um in Kooperation mit E1A Zellen vollständig zu transformieren (van der Eb und Zantema, 1992), während beide viralen Proteine hierzu alleine nicht in der Lage sind (Endter und Dobner, 2004). Die Mechanismen, durch die die beiden E1B Proteine die vollständige Transformation ermöglichen, sind verschieden, wirken jedoch möglicherweise additiv (Gallimore *et al.*, 1985; McLorie *et al.*, 1991). Beiden Proteinen ist gemein, dass sie, zumindest teilweise, der durch E1A induzierten Stabilisierung von p53 und damit der Apoptose und dem Zellzyklusarrest entgegenwirken (Debbas und White, 1993). Das E1B-19K Protein wirkt durch die Modulation der Apoptoseregulatoren Bax und CED4, ähnlich dem Protoonkogen Bcl2 sowie dem Entgegenwirken von antiproliferativen p53 Signalwegen, durch einen bisher unbekanntem Mechanismus (Sabbatini *et al.*, 1995; White, 1993, 2001).

Anders als beim E1B-19K Protein, sind die transformationsfördernden Eigenschaften des E1B-55K Proteins hauptsächlich abhängig von dessen direkter Modulation des Tumorsuppressors p53 (Yew *et al.*, 1994; Nevels *et al.*, 1997). Die komplette Inhibierung der p53-abhängigen Tumorsuppressor-Funktionen umfasst schrittweise unter anderem die Inhibierung dessen transaktivierender Funktionen durch direkte Interaktion (Sarnow *et al.*, 1982a; Kao *et al.*, 1990) und transkriptionelle Repression (Yew *et al.*, 1994; Martin und Berk, 1998, 1999) sowie die Relokalisation und Sequestration dieses Proteins in perinukleären Aggregaten (Endter *et al.*, 2001, 2005). Allerdings lassen neue Studien darüber hinaus weitere p53 unabhängige Mechanismen der E1B-55K induzierten Zelltransformation vermuten, die auf der Interaktion des viralen Proteins mit zellulären Faktoren wie Mre11 (Härtl *et al.*, 2008), dem Transkriptionsfaktor Daxx (Sieber und Dobner, 2007; Schreiner *et al.*, 2010) und PML Proteinen (Wimmer *et al.*, 2010a) beruhen.

### 1.2.2.2 Die E4-Genprodukte in der Transformation

Die E4-Region liegt am rechten Ende des viralen Genoms und wird gegensätzlich zu den E1-Genen von rechts nach links transkribiert (Abb. 1.3). Diese Transkriptionseinheit bringt durch alternatives Spleißen die sechs Genprodukte E4orf1, E4orf2, E4orf3, E4orf4, E4orf6 und E4orf6/7 hervor. Ein weiteres Genprodukt, das E4orf3/4 Protein, welches zuvor nicht auf Proteinebene während der Infektion nachgewiesen werden konnte, gehört nach neuesten Erkenntnissen vermutlich auch dazu (Speiseder, 2010). Die Untersuchungen verschiedener humaner Adenoviren lassen vermuten, dass alle eine homologe E4-Region besitzen, die ähnlich organisiert ist (Endter und Dobner, 2004). Zahlreiche Experimente der letzten Jahrzehnte haben zweifelsfrei gezeigt, dass die E1A und E1B Onkoproteine ausreichend sind, Nagetierzellen vollständig zu transformieren. Die Rolle der E4 Proteine bei der Virus-vermittelten Onkogenese war dagegen lange Zeit unklar. Nachdem in transformierten Zellen sowohl virale DNA mit

der E1- und E4-Region (Graham, 1984) als auch E4-spezifische Transkripte (Flint und Sharp, 1976; Esche, 1982; Esche und Siegmann, 1982) gefunden wurden und die Expression der E4-Region in E1-transformierten Zellen, deren Morphologie und tumorigenes Potential verändern kann (Öhman *et al.*, 1995; Shiroki *et al.*, 1984), ist ein Einfluss der Genprodukte dieser Region sehr wahrscheinlich. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Proteine E4orf3 und E4orf6 transformierendes und onkogenes Potential haben. Beide Proteine können in primären Nagetierzellen in Kooperation mit E1A und E1B-55K die Zahl transformierter Zellen deutlich erhöhen (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997, 1999a,b). Diese transformierten Zellen erlangen, im Vergleich zu ausschließlich E1-transformierten Zellen, zusätzliche Eigenschaften wie z. B. morphologische Veränderungen, die häufig mit onkogener Transformation assoziiert werden. Im Falle von E4orf6 kommt hierzu vor allem ein dramatischer Anstieg des Tumorwachstums in Versuchstieren (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1999a,b). Obwohl beide Proteine in der lytischen Infektion teilweise redundante Funktionen besitzen (Dobner und Kzhyshkowska, 2001; Täuber und Dobner, 2001), sind die Mechanismen für die verstärkte Transformation vermutlich teilweise verschieden. So konnte gezeigt werden, dass das E4orf3 Protein in der Lage ist, zelluläre PML-Strukturen zu zerstören und zu so genannten *track-like structures* umzuorganisieren (Carvalho *et al.*, 1995; Puvion-Dutilleul *et al.*, 1995b; Doucas *et al.*, 1996), was möglicherweise ein Auslöser für unkontrollierte Zellproliferation und neoplastische Transformation sein könnte (Endter und Dobner, 2004; Täuber und Dobner, 2001). Weiterhin kann das virale Protein Mre11, eine Komponente des Mre11 / Rad50 / NBS1 DNA-Reparaturkomplexes, in diese nukleären Strukturen lokalisieren (Araujo *et al.*, 2005; Stracker *et al.*, 2002, 2005) und mit einem weiteren, bei der DNA-Reparatur wichtigen Protein, der DNA-Proteinkinase (DNA-PK) interagieren (Boyer *et al.*, 1999). Zur Etablierung des hochgradig transformierten Phänotyps wird die Kombination dieser Faktoren und die Fähigkeit von E4orf3 mit den viralen Proteinen E1A, E1B-55K und E4orf6 zu interagieren (König *et al.*, 1999; Stracker *et al.*, 2002; Araujo *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005) als Ursache vermutet (Endter und Dobner, 2004; Täuber und Dobner, 2001).

Die zugrunde liegenden Eigenschaften von E4orf6 in der Transformation decken sich vermutlich weitgehend mit den Funktionen dieses Proteins während der lytischen Infektion, die bereits in Abschnitt 1.1.5 beschrieben wurden. Von besonderer Bedeutung ist hierbei das Entgegenwirken der durch E1A induzierten Stabilisierung des Tumorsuppressors p53 in Kooperation mit E1B-55K. Hierbei handelt es sich sowohl um eine Inaktivierung der Proteinfunktionen (Dobner *et al.*, 1996), wie dies auch bei E1B-55K alleine der Fall ist, als auch um die Induzierung des proteasomalen Abbaus des zellulären Proteins durch die Kooperation beider viraler Faktoren (Grand *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997, 1999a; Querido *et al.*, 1997, 2001a,b). Der hochgradig transformierte E4orf6-assoziierte Phänotyp korreliert demnach mit reduzierten p53 Gleichgewichtsmengen in den transformierten Zellen. In weitergehenden Experimenten konnte allerdings gezeigt werden, dass die Destabilisierung von p53 nur für die dramatische Erhöhung der Onkogenität in Versuchstieren von Bedeutung ist, während die verstärkte Zelltransformation nicht von der Reduzierung der p53 Menge abhängig ist. Die Region im E4orf6 Protein, die für die Etablierung dieses Phänotyps ausreichend scheint, ist die C-terminale Onkodomäne (Nevels *et al.*, 2000). Neben p53 ist vermutlich auch die durch

E1B-55K und E4orf6 induzierte Inaktivierung von Mre11 und der DNA-Ligase IV (Baker *et al.*, 2007; Stracker *et al.*, 2002, 2005) und die Interaktion von E4orf6 mit der DNA-PK von Bedeutung für die durch E4orf6 vermittelten zusätzlichen Eigenschaften. Funktionelle Analysen haben gezeigt, dass das virale Protein in der Lage ist, das Aneinanderfügen von gebrochenen DNA-Strängen zu inhibieren (Boyer *et al.*, 1999).

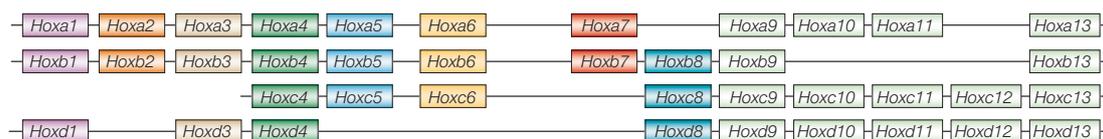
Jedoch besitzt das E4orf6 Protein nicht nur in Nagetieren, sondern auch in humanen Zellen onkogenes Potential. Mit E1A und E1B transformierte embryonale Nierenzellen (HEK293 Zellen) sind in Nagetieren nicht onkogen, durch zusätzliche Expression von E4orf6 können diese Zellen jedoch Tumore in den Versuchstieren induzieren (Moore *et al.*, 1996).

Doch nicht nur in Verbindung mit E1A und E1B-55K zusammen haben die beiden E4 Proteine, E4orf3 und E4orf6, tumorigenes Potential, auch die Expression mit E1A alleine hat eine Transformation zur Folge. Interessanterweise können in diesen Zellen zwar keine viralen Genprodukte nachgewiesen werden, die transformierten Zellen haben aber dennoch die Fähigkeit, Tumore hervorzubringen. Es wird vermutet, dass die viralen Proteine, dem „*Hit&Run*“-Modell der viralen Onkogenese entsprechend, dauerhaft onkogene Mutationen in den Zellen hervorrufen (Nevels *et al.*, 2001).

### 1.3 Funktionen von Homeobox Proteinen

Homeobox Gene sind Schlüsselregulatoren bei der Entwicklung von Körperstrukturen in der Embryogenese, der Organentwicklung, der Zelldifferenzierung und der Hämatopoese (Mark *et al.*, 1997; McGinnis und Krumlauf, 1992; Carroll *et al.*, 2005).

Dabei sind in Säugetieren zwei Klassen von Homeobox Genen bekannt, die dem *Antennapedia* Gen in *Drosophila melanogaster* ähnlichen und danach benannten Hox Gene, die in Clustern vorhanden sind, sowie weitere über das gesamte Genom verteilte Gene. Im Folgenden wird auf die eigentlichen Hox Gene bzw. deren Genprodukte eingegangen. Von diesen sind bei Säugetieren 39 Gene vorhanden, die in 13 paralogen Gruppen in vier Clustern auf den Chromosomen 7, 17, 2 und 12 angeordnet sind (Abb. 1.5) (Krumlauf, 1994). Diese vier Cluster entstanden durch Duplikationen im Laufe der Evolution aus einem einzigen Cluster mit wenigen Genen. Allen Produkten dieser Gene ist die Homeodomäne, ein 61 Aminosäuren langes DNA-Bindemotiv, das zu drei  $\alpha$ -Helices gefaltet ist, gemein. Dieser Bereich ist in allen Hox Proteinen sehr hoch konserviert (Scott *et al.*, 1989).



**Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Organisation von Hox Genen in Säugetieren.** Dargestellt ist die Anordnung der 39 Hox Gene in *Mus musculus* zu 13 paralogen Gruppen in vier Clustern (aus Pearson *et al.*, 2005).

Die Rolle von Hox Genen in der Kontrolle der Anterior-Posterior-Axenformation (von vorne

nach hinten) ist vermutlich ihre älteste Funktion (Pearson *et al.*, 2005). Änderungen in genetischen Hox Regulationswegen haben höchstwahrscheinlich zur evolutiven morphologischen Veränderung in triphoblastischen Tieren beigetragen (Averof und Akam, 1995; Averof und Patel, 1997; Carroll *et al.*, 2005; Jeong *et al.*, 2006; Hsia und McGinnis, 2003; Lemons und McGinnis, 2006), was die Bedeutung dieser Gene unterstreicht. Die Expressionsmuster der einzelnen Hox Proteine und damit ihr Einfluss auf den sich entwickelnden Embryo sind äußerst komplex. Die Anordnung der Hox Gene innerhalb der jeweiligen Cluster bestimmt ihre Expression, indem mehr 3'-gelegene Gene früher als mehr 5'-gelegene Gene aktiviert werden (zeitliche Kolinearität) und 3'-gelegene Gene in rostralen (in Richtung des Kopfes) Strukturen bzw. 5'-gelegene Gene in kaudalen (in Richtung des Schwanzes) Strukturen exprimiert sind (räumliche Kolinearität). Nachdem die Strukturen festgelegt sind, ist die Expression einzelner Hox Gene nicht mehr auf diese Bereiche beschränkt (Pearson *et al.*, 2005). Mittlerweile wird neben dieser zeitlichen und räumlichen Regulation die große Bedeutung weiterer Mechanismen wie gewebespezifische Regulation, Chromatin Modellierung durch *polycomb group* (pcG) Faktoren (Ringrose und Paro, 2004) und posttranskriptionelle Kontrolle durch miRNA (Yekta *et al.*, 2004; Naguibneva *et al.*, 2006; Chopra und Mishra, 2006) erkannt.

Nicht nur bei der Embryonal- sondern auch bei der Organentwicklung von Niere, Thymus, Brustdrüse, Lunge und weiteren Organen sind Hox Gene wichtige Faktoren (Krumlauf, 1994). Darüber hinaus tragen sie entscheidend zur Regulation der Differenzierung in adultem Geweben wie z. B. der Haut oder von Blutzellen bei (Scott und Goldsmith, 1993; Morasso *et al.*, 1996; Lawrence *et al.*, 1996; Giampaolo *et al.*, 1994).

Hox Proteine wirken als Transkriptionsfaktoren, indem sie regulatorische DNA-Bereiche binden und so die Expression vieler Zielgene beeinflussen (Pearson *et al.*, 2005). Zwar wurden bisher eine Reihe dieser Zielgene durch Computeranalyse vorhergesagt, aber nur wenige davon konnten tatsächlich experimentell bestätigt werden. Ausgehend von den bestätigten Genen sowie den Funktionen, die Hox Proteine ausüben, ist klar, dass sie in Zelladhäsion, Zellzyklus, Zelltod und Zellbewegung involviert sein müssen (Weatherbee *et al.*, 1998; Pearson *et al.*, 2005; Yokouchi *et al.*, 1995). Doch neben den transkriptionellen Funktionen gibt es zudem erste Hinweise, dass Hox Proteine weitere Transkriptions- und Homeodomänen-unabhängige Aufgaben erfüllen (Topisirovic *et al.*, 2003; Shiojima *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2000; Hyduk und Percival-Smith, 1996; Rubin *et al.*, 2007).

Die große Zahl an Hox Proteinen und die Tatsache, dass das vermutete DNA-Bindemotiv dieser Gruppe von Proteinen sehr kurz und einfach ist, ermöglicht die Bindung von vielen verschiedenen Hox Proteinen an dem betreffenden DNA-Abschnitt, weshalb die Notwendigkeit der Regulation besteht (Chen und Sukumar, 2003a). Dies wird höchstwahrscheinlich durch Kofaktoren beeinflusst. Dabei verändert das gewebespezifische Vorhandensein von Interaktionspartnern wie Pbx und MEIS die Fähigkeit der Hox Proteine an bestimmte DNA-Sequenzen zu binden. Hierbei spielen Bereiche außerhalb der Homeodomäne wie das Pentapeptid (Knoepfler und Kamps, 1995; Phelan *et al.*, 1995) und andere Regionen, die in den verschiedenen Hox Proteinen weniger hoch konserviert sind, eine Rolle. Ein weiterer vermuteter Mechanismus umfasst die gewebespezifische Chromatinorganisation und damit die Zugänglichkeit für

Hox Proteine (Lu *et al.*, 1995; Fernandez *et al.*, 2008; Lawrence *et al.*, 2005; Chauvet *et al.*, 2000). Darüber hinaus konnte in neueren Studien eine veränderte Funktion der verschiedenen Hox Proteine durch Phosphorylierung durch die Caseinkinase 2 (CK2) gefunden werden (Gay *et al.*, 1988; Gavis und Hogness, 1991; Bourbon *et al.*, 1995; Jaffe *et al.*, 1997). Die Phosphorylierung ändert hierbei *in vitro* die Interaktion mit DNA bzw. für die Funktion wichtigen regulatorischen Proteinen (Taghli-Lamalle *et al.*, 2008). Bei manchen Hox Proteinen konnte zudem eine Phosphorylierung durch die DNA-Proteinkinase (DNA-PK) gefunden werden (Schild-Poulter *et al.*, 2001). Obwohl bekannt ist, dass gewebsspezifische Kofaktoren sowie Regulationsmechanismen vorhanden sind, die die Funktionen der einzelnen Hox Proteine, unterschiedliche Zielgene entweder zu aktivieren oder zu reprimieren, beeinflussen, kann über die genauen molekularen Grundlagen bisher nur spekuliert werden (Chauvet *et al.*, 2000; Ch'ng und Kenyon, 1999).

Die Funktionen von Hox Proteinen in der normalen Entwicklung und bei der Tumorentstehung haben gemeinsam, dass beide Prozesse durch Veränderungen in der Balance zwischen Zellproliferation und -differenzierung geprägt sind. Daher ist es nicht verwunderlich, dass veränderte Hox Expressionsmuster in verschiedenen malignen Erkrankungen gefunden wurden (Chen und Sukumar, 2003a). Es konnte gezeigt werden, dass Hox Gene in myeloider Leukämie beim Menschen involviert sind und auch in nicht-myeloiden Krebserkrankungen Schlüsselfaktoren sind (Lawrence *et al.*, 2005). Ihre Fehlregulation führt ferner zu soliden Tumoren verschiedener Gewebe (Abate-Shen, 2002; Grier *et al.*, 2005; Cillo *et al.*, 2001; Raman *et al.*, 2000). Dabei ist die Expression der Hox Proteine verglichen mit normalem Gewebe in manchen Fällen erhöht, in anderen herunter reguliert. In dem jeweiligen zellulären Kontext fungieren diese Faktoren also entweder als Tumorsuppressoren oder als Onkogene (Raman *et al.*, 2000) wie dies auch für die transkriptionelle Aktivität dieser Proteine z. B. bei der Embryonal- oder Organentwicklung der Fall ist. Dabei treten Unterschiede in den verschiedenen Tumoren auf und kein Hox Gen ist in unterschiedlichen Tumoren auf die gleiche Weise verändert (Chen und Sukumar, 2003a).

Die genaue Rolle der Hox Proteine bei der Entstehung von tumorigenen Erkrankungen ist bislang weitgehend unklar und scheint, je nach Tumorart, unterschiedlich zu sein. Es besteht jedoch kein Zweifel, dass die Fehlregulation dieser Proteine zur Tumorgenese beitragen kann. Dabei erfolgt die Neoplasie über einen mehrstufigen Prozess, der Zellzyklusregulation, Apoptose, Angiogenese und Zell-Zell-Kommunikation umfasst (Chen und Sukumar, 2003b).

### 1.3.1 Funktionen von HoxB7

Wie bei allen Hox Genen sind auch die unterschiedlichen Funktionen von HoxB7 hauptsächlich im Kontext mit den anderen Genen des jeweiligen Clusters zu sehen. Dennoch konnten für einzelne Hox Proteine in bestimmten zellulären Zusammenhängen spezifische Funktionen identifiziert werden, so auch für HoxB7. Eine der Funktionen dieses zellulären Proteins ist in der DNA-Doppelstrangbruch Reparatur, wobei es an die DNA-Proteinkinase (DNA-PK) binden und vermutlich, direkt oder indirekt, deren Aktivität verstärken kann. Weiterhin liegt auch eine Interaktion mit Rad 52 vor, ob und wie eine Regulation hierdurch erfolgt, ist aber

unklar (Rubin *et al.*, 2007).

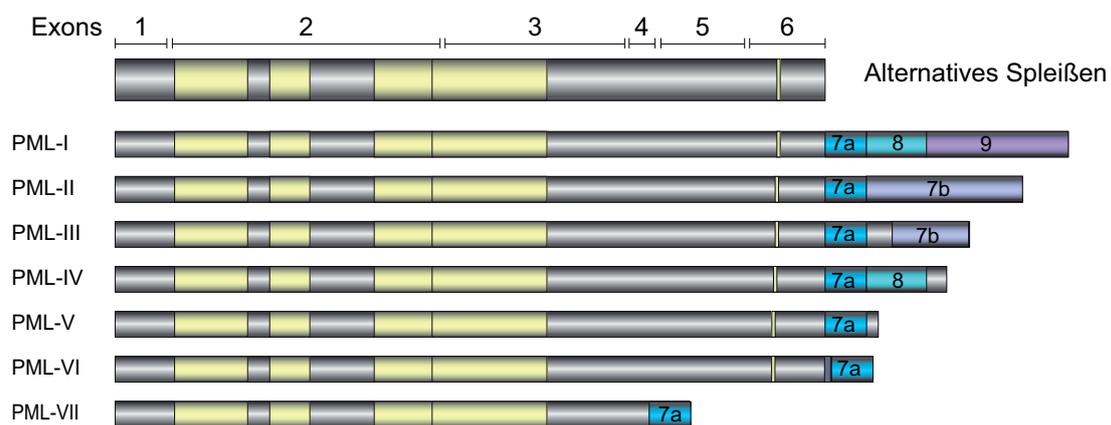
Die meisten HoxB7 spezifischen beschriebenen Funktionen stehen im Zusammenhang mit Tumorentstehung. Bereits vor fast 20 Jahren konnte in einem Transformationsexperiment das onkogene Potential verschiedener Hox Proteine, darunter auch HoxB7, nachgewiesen werden (Maulbecker und Gruss, 1993). Neben dem onkogenen Potential dieses Proteins *in vitro* wurde später durch zahlreiche weitere Studien gezeigt, dass HoxB7 höchstwahrscheinlich eine Rolle bei der Tumorgenese spielt. So wurde in verschiedenen Zelllinien aus Melanomen, Eierstock- und Brusttumoren sowie in primären Tumoren eine Überexpression dieses Hox Proteins beobachtet (Care *et al.*, 1996; Naora *et al.*, 2001). Weiterhin induziert die Expression von HoxB7 eine verlängerte Proliferation einer bestimmten Population hematopoetischer Zellen (Care *et al.*, 1999) und scheint daher präneoplastische Funktionen zu haben (Fernandez *et al.*, 2008). Auch in humanen Brustkrebszellen wird durch Überexpression von HoxB7 die Proliferationsrate verstärkt und die Tumorentwicklung unterstützt (Care *et al.*, 1998). Beim Vergleich der HoxB7 mRNA Expression in Tumorzellen während der Brustkrebsentstehung von primären Tumoren bis hin zu Metastasen, kann eine schrittweise Zunahme der HoxB7 Expression im Zuge der Tumorentwicklung beobachtet werden. Dies scheint von der Fähigkeit des Proteins abzuhängen, Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) zu induzieren, ein Prozess der zunächst als bedeutsam für die Embryonal- und Organentwicklung erachtet wurde, jetzt aber auch mit der Krebsentstehung in Zusammenhang gebracht wird (Wu *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Daten weist eine andere Studie jedoch darauf hin, dass die Funktion von HoxB7 von den physiologischen Bedingungen abhängt und es gut möglich ist, dass das Protein alleine nicht ausreichend ist, Tumore zu induzieren, sondern hierfür weitere Onkoproteine benötigt (Chen *et al.*, 2008). Zur Beantwortung der genauen Rolle von HoxB7 bei der Onkogenese sind daher weitere Untersuchungen erforderlich.

## 1.4 Zusammensetzung und Funktion der subzellulären PML-NBs

PML-NBs sind Multiproteinkomplexe, die mit der nukleären Matrix assoziiert sind und je nach der Zusammensetzung ihrer verschiedenen Komponenten unterschiedliche Funktionen erfüllen (Stuurman *et al.*, 1992; Bernardi und Pandolfi, 2007). Weitere Namen für PML-NBs sind PODs, ND10 oder *Kremer bodies*. Die Hauptkomponente der nukleären Strukturen sind die PML Proteine, von denen, bedingt durch alternatives Spleißen, zahlreiche Genprodukte vorliegen, die aufgrund ihrer Sequenz zu sieben Isoformen gruppiert werden (Abb. 1.6) (Fagioli *et al.*, 1992; Bernardi und Pandolfi, 2007; Jensen *et al.*, 2001). Die PML Proteine wurden als Auslöser der akuten promyelozytischen Leukämie (APL) entdeckt, bei der sie als Teil einer chromosomalen Translokation t(15;17) mit dem Gen RAR $\alpha$  verknüpft vorliegen (de The *et al.*, 1991; Duprez *et al.*, 1992; Gillespie *et al.*, 1991; Goddard *et al.*, 1991; Kakizuka *et al.*, 1991; Pandolfi *et al.*, 1992). In weiteren Studien wurde PML als Tumorsuppressor identifiziert, der in verschiedenen humanen Tumorarten fehlreguliert ist (Koken *et al.*, 1995; Salomoni und Pandolfi, 2002; Gurrieri *et al.*, 2004a,b; Scaglioni *et al.*, 2006; Salomoni *et al.*, 2008).

In allen bisher untersuchten Säugetierzellen konnten pro Zellkern zwischen 1 und 30 PML-NBs mit einem Durchmesser von 0,2-1  $\mu\text{m}$  während des gesamten Zellzyklus gefunden werden, wobei ihre Zahl abhängig von Zelltyp, -zyklus, Differenzierungsgrad und Stress-induziert schwankt (Dellaire und Bazett-Jones, 2004; Dellaire *et al.*, 2006).

Die PML Proteine dienen als Gerüst dieser subnukleären Strukturen und assoziieren mit weiteren Faktoren, von denen bisher mehr als 160 identifiziert werden konnten. Der größte Teil hiervon liegt meist jedoch nur transient vor, neben den PML Proteinen selbst sind nur Sp100, Daxx und SUMO-1 dauerhaft assoziiert. Neben den bereits genannten ist eine direkte Interaktion mit PML auch für p53, pRB, den Transkriptionsaktivator CBP (*CREB binding protein*), die Transkriptionsrepressoren Daxx und Sp100 sowie das Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc9, das Ubiquitin-ähnliche Protein SUMO-1 und den Translationsinitiationsfaktor eIF4E aufgedeckt worden. Die Formation von PML-NBs sowie die Funktionen dieser Proteinkomplexe werden dabei entscheidend durch postranskriptionelle Modifikation mit dem Ubiquitin-ähnlichen Protein SUMO-1 gesteuert (Zhong *et al.*, 2000a; Best *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2006; van Damme *et al.*, 2010).



**Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Struktur von PML Proteinen.** Dargestellt sind die sieben PML Isoformen (nach Bernardi und Pandolfi, 2007).

Die Assoziation mit verschiedenen Komponenten vermittelt die unterschiedlichen Funktionen von PML-NBs bei der Apoptose (Takahashi *et al.*, 2004), Differenzierung (Grobelyny *et al.*, 2000), DNA-Reparatur (Dellaire und Bazett-Jones, 2004), posttranslationaler Modifikation (Pearson *et al.*, 2000), Proteolyse (Lafarga *et al.*, 2002; Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2001), Transkriptionsregulation (Boisvert *et al.*, 2000; Borden, 2002; Zhong *et al.*, 2000b), Tumorsuppression (Salomoni und Pandolfi, 2002) oder der Zellzyklusprogression (Ruggero *et al.*, 2000).

Darüber hinaus spielen PML-NBs auch bei der antiviralen Zellantwort eine wichtige Rolle, was durch die Beobachtung gestützt wird, dass sich nach Induktion von Interferon Typ I ( $\text{IFN}\alpha$ ) und Interferon Typ II ( $\text{IFN}\gamma$ ) die Zahl und Größe der PML-NBs etwa verdoppelt (Nisole *et al.*, 2005).

Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass viele DNA- und RNA-Viren mit PML-NBs in Wechselwirkung treten und die viralen Proteine PML-NBs modulieren, um einer antiviralen Zellant-

wort entgegen zu wirken. Es wurde entdeckt, dass die Transkriptions- und Replikationszentren vieler Viren in der Nähe von PML-NBs lokalisiert sind. Für das HSV-1 (Herpes-Simplex Virus-1), das SV40 (Simian-Virus Typ-40) und das HCMV (Humanes Cytomegalie Virus) konnte eine enge Verknüpfung mit diesen nukleären Strukturen gefunden werden; und auch das Adenovirus Typ 5 ist mit ihnen assoziiert (Everett, 2001; Maul *et al.*, 1993, 1996). In weitreichenden Studien wurden für viele DNA-Viren, wie Adeno-, Herpes-, Hepatitis- und Papillomviren virale Faktoren identifiziert, deren Funktion die Modulierung und Auflösung der PML-NB Strukturen ist (Bell *et al.*, 2000; Borden *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 1995; Day *et al.*, 1998; Everett und Maul, 1994; Everett, 2006; Florin *et al.*, 2002; Kyratsous und Silverstein, 2009; Puvion-Dutilleul *et al.*, 1995b; Tavalai und Stamminger, 2008; Ullman und Hearing, 2008; Woodhall *et al.*, 2006). Auch Proteine von RNA-Viren wie HIV-1 (Humanes Immundefizienzvirus Typ-1) und HTLV-1 (Humanes T-Zell-Leukämievirus Typ-1) wurden PML-NB-modulierende Funktionen zugesprochen (Desbois *et al.*, 1996; Doucas und Evans, 1999; Huang *et al.*, 2008; Turelli *et al.*, 2001). Die Wirkmechanismen dieser viralen Proteine sind dabei unterschiedlich. Einige der viralen Faktoren sind in der Lage, den proteasomalen Abbau von Komponenten der PML-NBs zu induzieren z. B. ist das ICP0 Protein (*intracellular protein 0*) von HSV-1 ausreichend, um SUMO-1 modifiziertes PML, Daxx und Sp100 dem Abbau zuzuführen. Andere virale Proteine bewirken die strukturelle Veränderung der PML-NBs. So führt die lytische Replikation von EBV (Epstein Barr Virus) zur Umverteilung von Sp100 und Daxx, später auch von PML (Everett, 2001; Bell *et al.*, 2000).

Auch bei Adenoviren erfolgt keine Zerstörung sondern lediglich eine Umorganisation der PML-NBs zu fädigen Strukturen (*track-like structures*) vermittelt durch das E4orf3 Protein (Carvalho *et al.*, 1995; Doucas *et al.*, 1996; Ishov und Maul, 1996; Puvion-Dutilleul *et al.*, 1995a). Weitere adenovirale mit PML-NBs assoziierte Proteine sind das E1A (Carvalho *et al.*, 1995; Wimmer, 2010) und das E1B-55K Protein (Wimmer *et al.*, 2010a). Als weiterer kürzlich identifizierter PML Interaktionspartner gilt E4orf6 (Wimmer, 2010). Wenngleich ein Einfluss von PML-NBs vermutet wird, so bleibt ihre genaue Rolle für die lytische Virusreplikation bisher ungeklärt.

Viele der an den PML-NBs lokalisierenden Faktoren sind Tumorsuppressorproteine wie beispielsweise p53 und PML oder Transkriptionsfaktoren wie Daxx und Sp100. Dies und die Tatsache, dass das PML Protein mit der Entstehung maligner Erkrankungen in Verbindung steht und höchstwahrscheinlich mit allen wichtigen adenoviralen Onkoproteinen (E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6) interagiert, legt auch eine entscheidende Rolle von PML und den PML-NBs in der Adenovirus-induzierten Zelltransformation nahe.

## 1.5 Aufgabenstellung

Das multifunktionelle E4orf6 Protein ist für eine produktive virale Infektion nötig und wirkt dabei auf allen Ebenen der Genexpression. Diese Funktionen stehen teilweise im Zusammenhang mit der Fähigkeit dieses Proteins, die durch die Genprodukte E1A und E1B-55K induzierte Zelltransformation zu verstärken. Ein C-terminaler Abschnitt des E4orf6 Proteins,

die Onkodomäne, wurde hierbei für morphologische Zellveränderungen und die Erhöhung der Zahl transformierter Zellen als ausreichend befunden. Aufgrund von CD-Spektroskopie und Strukturvorhersagen wird angenommen, dass es sich bei diesem Bereich um eine eigenständige Proteindomäne mit  $\alpha$ -helicaler Struktur handelt. Auch erste Experimente mit diesem Teil des Proteins, ausgehend von einem Plasmid, zeigen, dass es in der Lage ist, manche Funktionen des E4orf6 Proteins zu erfüllen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher der Einfluss des C-Terminus des E4orf6 Proteins in der Infektion untersucht werden. Hierbei sollte ermittelt werden, ob diese Proteindomäne ausreichend ist, die Funktionen von E4orf6 in einer produktiven Virusreplikation zu erfüllen. Dazu sollten zunächst Virusmutanten, die nur die Onkodomäne enthalten, hergestellt werden. Diese neu generierten Viren sollten anschließend charakterisiert werden.

Wie die Arbeiten der vergangenen Jahre weiterhin zeigen konnten, scheint E4orf6 in der Transformation durch zwei genetisch unterscheidbare, von der p53-Stabilität abhängige und unabhängige, Mechanismen zu wirken. Während die Induktion des durch E4orf6 verstärkten Tumorstwachstums von p53 abhängt, sind die morphologische Hypertransformation und die erhöhte Transformationsrate unabhängig von dem zellulären Protein. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit zur Aufklärung eines weiteren vermutlich p53-unabhängigen E4orf6-vermittelten Transformationsmechanismus nach neuen, mit der Onkodomäne interagierenden, zellulären Proteinen gesucht werden. Diese potentiellen Interaktoren sollten in der Transformation untersucht werden. Nachdem die E4orf6 Funktionen in der Transformation mit denen in der Infektion teilweise überlappen, sollte weiterhin ein möglicher Einfluss dieser Faktoren und ihre Rolle während einer Adenovirusinfektion untersucht werden.

Insgesamt sollen die Studien neue Einblicke bezüglich der Rolle von E4orf6 bzw. dessen Onkodomäne in der Zelltransformation liefern. Darüber hinaus sollen durch mögliche neue zelluläre Interaktionspartner gegebenenfalls die Kenntnisse über dieses virale Protein in der Virusinfektion erweitert werden. Die Ergebnisse könnten als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen, um erweiterte Kenntnisse bezüglich der virusinduzierten Zelltransformation und Tumorentstehung zu erlangen.

---

## 2 Material

### 2.1 Zellen

#### 2.1.1 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

Bezeichnung	Merkmal
Dh5 $\alpha$	<i>supE44</i> , $\Delta$ <i>lacU169</i> , ( $\Phi$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> ), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> (Hanahan und Meselson, 1983)
XL2-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , [ <i>F</i> <sup>+</sup> <i>proAB</i> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> <i>Z</i> $\Delta$ <i>M15</i> , <i>Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> ), <i>Amy</i> , <i>Cam</i> <sup>r</sup> ] (Stratagene)

#### 2.1.2 Hefestämme

In dieser Arbeit wurden folgende Hefestämme verwendet:

Bezeichnung	Merkmal
Y152	<i>MATa</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>trp1-901</i> , <i>his3-<math>\Delta</math>200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>gal4<math>\Delta</math>gal80<math>\Delta</math>URA3</i> : <i>:GAL-lacZ</i> , <i>LYS2</i> : <i>:GAL-HIS3</i> (Durfee <i>et al.</i> , 1993)

#### 2.1.3 Säugerzelllinien

In dieser Arbeit wurden folgende Säugerzelllinien verwendet:

Bezeichnung	Merkmal
2E2	293 EBNA Tet Zelllinie, generiert aus HEK 293; HAdV5 E2A und E4orf6 Tetrazyklin-abhängig induzierbar (Catalucci <i>et al.</i> , 2005)
AB120	Etablierte Rattenzelllinie, stabil transformiert mit HAdV5 E1A und E1B-55K (Nevels <i>et al.</i> , 1999a)
ABS1	Etablierte Rattenzelllinie, stabil transformiert mit HAdV5 E1A, E1B-55K und E4orf6 (Nevels <i>et al.</i> , 1999a)

Fortsetzung nächste Seite

Bezeichnung	Merkmal
A-UKE9	primäre humane Fruchtwasserzellen, Mischpopulation (anonyme Spenderin aus dem UKE)
A-UKE10	primäre humane Fruchtwasserzellen, Mischpopulation (anonyme Spenderin aus dem UKE)
A-UKE14	primäre humane Fruchtwasserzellen, Mischpopulation (anonyme Spenderin aus dem UKE)
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, die die HAdV5 E1-Region stabil exprimieren ( <i>human embryonic kidney cells</i> ) (Graham <i>et al.</i> , 1977)
HEK 293T	HEK 293 Zellen, die das Large T Antigen des SV40 (Simian Virus 40) exprimieren (Sena-Esteves <i>et al.</i> , 1999)
HeLa	Humane Zervixkarzinom-Zelllinie (Gey <i>et al.</i> , 1952)
MIO-M1	Humane pseudoprimäre retinale Glia Zellen (Limb <i>et al.</i> , 2002)
MRC5	Humane fötale Lungenzelllinie (Jacobs <i>et al.</i> , 1970)
BRK	Primäre Nierenzellen aus 3-5 Tage alten CD-Ratten
pSuper	H1299 Zelllinie mit leerem pSuper Vektor (diese Arbeit)
shHox	H1299 Zelllinie mit shRNA gegen HoxB7 in pSuper Vektor; shRNA 5´ GAT CCC CGA GCC GAG TTC CTT CAA CAT TCA AGA GAT GTT GAA GGA ACT CGG CTC TTT TTA3´ (diese Arbeit)
U2OS	Humane, epitheliale Osteosarkom Zelllinie, Wildtyp p53 und Rb, p16 negativ (Ponten und Saksela, 1967)
W162	Verozellen (permanente Affennieren-Zellen) transformiert mit der HAdV2 E4-Region (Weinberg und Ketner, 1983)

## 2.2 Adenoviren

Die in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Viren wurden im H5pg4100-Rückgrat hergestellt.

Bezeichnung	Merkmal
H5pg4100	Wildtyp HAdV5 mit einer 1863 bp langen Deletion (nt 28602 bis nt 30465) des E3-Leserahmens (Kindsmüller <i>et al.</i> , 2007)
H5pm4115	HAdV5 E4orf6-Mutante (L245P) mit einem AS Austausch von Leucin zu Prolin an der Position 245 (Stammsammlung der Arbeitsgruppe)
H5pm4139	HAdV5 E4orf6-Mutante (L47G/L122S) mit einem AS Austausch von Leucin zu Glycin an der Position 47 und einem AS Austausch von Leucin zu Serin an der Position 122 (Blanchette <i>et al.</i> , 2008)
H5pm4149	HAdV5 E1B-55K-Mutante mit vier Stoppkodons an den AS-Positionen 3, 8, 86 und 88 (Kindsmüller <i>et al.</i> , 2009)

Fortsetzung nächste Seite

Bezeichnung	Merkmal
H5pm4150	HAdV5 E4orf3-Mutante mit einer <i>frame shift</i> Mutation nach Kodon 37 durch ein eingefügtes Thymidin an Position nt 34592 (erster Stopp bei Kodon 38) (Speiseder, 2006)
H5pm4154	HAdV5 E4orf6-Mutante mit einem AS Austausch zum Stoppkodon an der Position 66 (Blanchette <i>et al.</i> , 2004)
H5pm4166	HAdV5 E4orf4-Mutante mit verändertem Startkodon und eingeführtem Stoppkodon an AS-Position 12 (Miron <i>et al.</i> , 2009)
H5pm4182	HAdV5 E4orf6-Mutante mit einer Deletion der AS 62-202 (diese Arbeit)
H5pm4229	HAdV5 E4orf6-Doppelmutante, Kombination aus H5pm4182 und H5pm4115 (diese Arbeit)

## 2.3 Nukleinsäuren

### 2.3.1 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden als Startermoleküle (Primer) für Sequenzierreaktionen, 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.

Nr.	Bezeichnung	Sequenz [5' – 3']	Verwendung
64	E1B bp20-43 fwd	CGC GGG ATC CAT GGA GCG AAG AAA CCC ATC TGA GC	virale DNA-Replikation
110	E1B 361-389 rev	CGG TGT CTG GTC ATT AAG CTA AAA	virale DNA-Replikation
635	pcDNA3-fwd	ATG TCG TAA CAA CTC CGC	Sequenzierung
840	E4orf6 fwd 32246bp	GCA GAT CTG TTT GTC ACG CC	Sequenzierung
1371	18s rRNA fwd	CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA	RT-PCR
1372	18s rRNA rev	GCT GGA ATT ACC GCG GCT	RT-PCR
1441	HexonqPCR fwd	CGC TGG ACA TGA CTT TTG AG	RT-PCR
1442	HexonqPCR rev	GAA CGG TGT GCG CAG GTA	RT-PCR
1445	E4orf6-onco fwd	ATT CAT ATG AGC TTT GGA TAC AGC GCC	Klonierung
1446	E4orf6-onco rev	ATG AAT TCG CCT ACA TGG GGG TAG AGT C	Klonierung
1542	Inv.E4orf6 fwd	GCC ATG AGC TTT GGA TAC AGC	Klonierung
1543	Inv.E4orf6 rev	GTA ACT CAC GTT GTG CAT TGT CAA	Klonierung
1569	E1B qPCR fwd	GAG GGT AAC TCC AGG GTG CG	RT-PCR
1570	E1B qPCR rev	TTT CAC TAG CAT GAA GCA ACC ACA	RT-PCR

Fortsetzung nächste Seite

Nr.	Bezeichnung	Sequenz [5' – 3']	Verwendung
1606	shRNA HoxB7 fwd	GAT CCC CGA GCC GAG TTC CTT CAA CAT TCA AGA GAT GTT GAA GGA ACT CGG CTC TTT TTA	Klonierung
1607	shRNA HoxB7 rev	AGC TTA AAA AGA GCC GAG TTC CTT CAA CAT CTC TTG AAT GTT GAA GGA ACT CGG CTC GGG	Klonierung
1686	E1A RT fwd	GTG CCC CAT TAA ACC AGT TG	RT-PCR
1687	E1A RT rev	GGC GTT TAC AGC TCA AGT CC	RT-PCR
1690	Hox410-430 fwd	AGA GTA ACT TCC GGA TCT A	RT-PCR
1691	Hox670-680 rev	TCG GCT TCA GCC CTG TCT T	RT-PCR
1767	E4orf6 qPCR rev	CCC TCA TAA ACA CGC TGG AC	RT-PCR
1768	E4orf6 qPCR fwd	GCT GGT TTA GGA TGG TGG TG	RT-PCR
1767	E4orf6 qPCR rev	CCC TCA TAA ACA CGC TGG AC	RT-PCR
2240	HoxB7 Promotor neu fwd	ATC TCG AGC AAC ATG AAA CTG CCT ATT CAC GC	Klonierung
2241	HoxB7 Promotor neu rev	ATA AGC TTG GAC GTT TTA GTG TCG GTT TTA CG	Klonierung

### 2.3.2 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.

Nr.	Bezeichnung	Verwendung
42	pGEX-2Tk	bakterieller Expressionsvektor für Fusionsproteine mit GST-Tag
104	pACT	Vektor für die humane cDNA-Datenbank aus $\lambda$ ACT, ADC1 Promotor (Durfee <i>et al.</i> , 1993)
136	pcDNA3	Expressionsvektor für Säugerzellen, CMV-Promotor (Invitrogen)
138	pGL3 Basic	SV40 basierter eukaryotischer Luciferase-Expressionsvektor
213	pGBKT7	(TCC) Expression von Fusionsproteinen mit der Gal4-DNA-Bindedomäne in Hefen; Deletion in der EcoRI-Schnittstelle (GAATTC->GATTC) zur Veränderung des Leserahmens

### 2.3.3 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.

Nr.	Bezeichnung	Vektor	Fremdgen	Ref.
	pGL3-Basic Prom E4	pGL3-Basic	E4 Promotor	1
102	E4orf6/7	pCMV	HAdV5 E4orf6/7	2
130	pGEX E4-34kDa TOPP6	pGEX-2Tk	HAdV5 E4orf6	2
247	pGL Ti-Luc	pGL2-Basic	Tdt Initiator	2
499	pRE-LUC	unbekannt	CMV-Promotor, fünf p53-Bindungsstellen	3
573	E4orf6 dl152-294	pGEX-2Tk	HAdV5 E4orf6	2
574	E4orf6 dl224-294	pGEX-2Tk	HAdV5 E4orf6	2
575	E4orf6 dl271-294	pGEX-2Tk	HAdV5 E4orf6	2
576	E4orf6 dl1-203	pGEX-2Tk	HAdV5 E4orf6	2
581	E4orf6 dl1-55	pGEX-2Tk	HAdV5 E4orf6	2
582	E4orf6/7	pGEX-2Tk	HAdV5 E4orf6	2
583	E4orf6 dl1-108	pGEX-2Tk	HAdV5 E4orf6	2
1155	E4-Box-S2	pPG-S2	HAdV5 E4-Region	2
1319	pcDNA-E1B-55K	pcDNA3	HAdV5 E1B-55K	2
1467	CyclinG-Luc	unknown	CyclinG Promotor	2
1664	E4orf6 splice-fix	pcDNA3	HAdV5 E4orf6	2
1898	pGBKT7 Ad5E4orf6onco-wt	pGBKT7	HAdV5 E4orf6-Onkodomäne	4
1962	E4-Box E4orf6 del	pPG-S2	HAdV5 E4 Region	4
1963	Ad5pPG-S2 E4orf6 del	pPG-S2	HAdV5 Genom	4
1968	pCMV-VSV-G	pCMV	Hüllprotein G (VSV-G) des vesikulären Stomatitis Virus	5
1969	pRSV-Rev	pRSV	HIV-1 Rev	6
1970	pMDLg/pRRE	pMDL	HIV-1 Gag, HIV-1 Pol	6
2055	Flag-PML I	pLKO	humanes PML I	2
2056	Flag-PML II	pLKO	humanes PML II	2
2057	Flag-PML III	pLKO	humanes PML III	2
2058	Flag-PML IV	pLKO	humanes PML IV	2
2059	Flag-PML V	pLKO	humanes PML V	2
2060	Flag-PML VI	pLKO	humanes PML VI	2
2073	E4orf6 dl271-292-HA	pcDNA3	HAdV5 E4orf6	4
2075	E4orf6 HA-dl1-203-HA	pcDNA3	HAdV5 E4orf6	4
2076	E4orf6 HA	pcDNA3	HAdV5E4orf6	4
2082	E4orf6 dl 249-270	pcDNA3	HAdV5 E4orf6	4
2274	shHoxB7-pSuper.retro.puro	pSuper.retro.puro	shRNA gegen HoxB7	4
2376	E4orf6-R275E	pcDNA3	HAdV5 E4orf6	4
2377	E4orf6-Q279A	pcDNA3	HAdV5 E4orf6	4
2378	E4orf6-H280/81A	pcDNA3	HAdV5 E4orf6	4
2379	E4orf6-R282E	pcDNA3	HAdV5 E4orf6	4
2380	E4orf6-M286L	pcDNA3	HAdV5 E4orf6	4
2381	E4orf6-D288V	pcDNA3	HAdV5 E4orf6	4
2382	E4orf6-D290V	pcDNA3	HAdV5 E4orf6	4
2420	pGL3-Basic Prom E1A	pGL3-Basic	E1A Promotor	2
2421	pGL3-Basic Prom E1B	pGL3-Basic	E1B Promotor	2
2422	pGL3-Basic Prom pIX	pGL3-Basic	pIX Promotor	2

Fortsetzung nächste Seite

Nr.	Bezeichnung	Vektor	Fremdgen	Ref.
2423	pGL3-Basic Prom E2e	pGL3-Basic	E2 <sub>early</sub> Promotor	2
2424	pGL3-Basic Prom MLP	pGL3-Basic	ML Promotor	2
2425	pGL3-Basic Prom E3	pGL3-Basic	E3 Promotor	2
2428	pGL3-Basic Prom E2l	pGL3-Basic	E2 <sub>late</sub> Promotor	2
2432	E4orf6 onco-R275E	pcDNA3	HAdV5E4orf6-Onkodomäne	4
2433	E4orf6 onco-Q279A	pcDNA3	HAdV5E4orf6-Onkodomäne	4
2434	E4orf6 onco-H280/81A	pcDNA3	HAdV5E4orf6-Onkodomäne	4
2435	E4orf6 onco-R282E	pcDNA3	HAdV5 E4orf6-Onkodomäne	4
2436	E4orf6 onco-M286L	pcDNA3	HAdV5 E4orf6-Onkodomäne	4
2437	E4orf6 onco-D288V	pcDNA3	HAdV5 E4orf6-Onkodomäne	4
2438	E4orf6 onco-D290V	pcDNA3	HAdV5 E4orf6-Onkodomäne	4
2472	pcDNA-HA-E1A-12S	pcDNA3	HAdV5 E1A-12S	2
2473	E4-Box del62-202-L245P	pPG-S2	HAdV5 E4 Region	4
2474	Ad5pPG-S2 E4orf6del-L245P	pPG-S2	HAdV5 Genom	4
2475	pcDNA-HA-E1A-13S	pcDNA3	HAdV5 E1A-13S	2
2521	E4orf6 dl 182-213	pcDNA3	HAdV5 E4orf6	2
2522	E4orf6 dl 214-228	pcDNA3	HAdV5 E4orf6	2
2523	E4orf6 dl 229-248	pcDNA3	HAdV5 E4orf6	2
2524	HoxB7-Flag	pcDNA3	humanes HoxB7	2
2533	HoxB7 Promotor Amniozyten lang	pGL3-Basic	HoxB7 Promotor	4

<sup>1</sup>zur Verfügung gestellt von J. S. Mymryk <sup>2</sup>Stammsammlung der Arbeitsgruppe <sup>3</sup>zur Verfügung gestellt von N. Horikoshi <sup>4</sup>diese Arbeit <sup>5</sup>Beyer *et al.*, 2002 <sup>6</sup>Dull *et al.*, 1998

## 2.4 Antikörper

### 2.4.1 Primärantikörper

Folgende Primärantikörper wurden für *Western Blot*- und Immunfluoreszenzanalysen verwendet:

Bezeichnung	Merkmal
1807	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das E4orf6-Protein von HAdV5 (Boivin <i>et al.</i> , 1999)
2A6	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das E1B-55K-Protein von HAdV5 (Sarnow <i>et al.</i> , 1982b)
3F10	Monoklonaler Ratten-Antikörper gegen das HA-Epitop (Roche)
610	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das HAdV5 E1A Protein (zur Verfügung gestellt von R. Grand)
6B10	Monoklonaler Ratten-Antikörper gegen das L4-100K-Protein von HAdV5 (Stammsammlung der Arbeitsgruppe)
$\alpha$ -Aktin	(AC-15) Monoklonaler Maus-Antikörper gegen $\beta$ -Aktin (Sigma)

Fortsetzung nächste Seite

Bezeichnung	Merkmal
$\alpha$ -Flag-M2	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das FLAG-Epitop (Sigma)
$\alpha$ -HoxB7	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das humane HoxB7 Protein (Santa Cruz)
$\alpha$ -late	Polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen späte Strukturproteine von HAdV5 (Stammsammlung der Arbeitsgruppe)
$\alpha$ -Mre11	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen das humane Mre11-Protein (Abcam)
$\alpha$ -p53	(DO1) Monoklonaler Maus-Antikörper gegen ein aminoterminales Epitop von p53 des Menschen (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) (Vojtesek <i>et al.</i> , 1992)
B6-8	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das E2A-72K-Protein von HAdV5 (Reich <i>et al.</i> , 1983)
M73	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen das HAdV5 E1A-12S und 13S Protein (Harlow <i>et al.</i> , 1985)
RSA3	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen den Aminoterminus des E4orf6-Proteins von HAdV5 (Marton <i>et al.</i> , 1990)

#### 2.4.2 Sekundärantikörper

Für *Western Blot*-Analysen wurden folgende Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper der Firma Amersham Life Science verwendet:

Bezeichnung	Merkmal
HRPO- $\alpha$ -Maus	IgG Antikörper gegen Maus IgGs aus Schaf
HRPO- $\alpha$ -Ratte	IgG Antikörper gegen Ratte IgGs aus Ziege
HRPO- $\alpha$ -Kaninchen	IgG Antikörper gegen Kaninchen IgGs aus Esel

Folgende Sekundärantikörper wurden für Immunfluoreszenzanalysen verwendet:

Bezeichnung	Merkmal
FITC- $\alpha$ -Ratte IgG	Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gekoppelter Antikörper gegen Ratte IgGs aus Esel; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (H + L; Dianova)
FITC- $\alpha$ -Maus IgG	Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gekoppelter Antikörper gegen Maus IgGs aus Esel; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (H + L; Dianova)
FITC- $\alpha$ -Kaninchen IgG	Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen IgG aus Esel; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (H + L; Dianova)
Texas Red- $\alpha$ -Ratte IgG	Texas Red-gekoppelter Antikörper gegen Ratte IgGs aus Esel; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (H + L; Dianova)
Texas Red- $\alpha$ -Maus IgG	Texas Red-gekoppelter Antikörper gegen Maus IgGs aus Esel; AffiniPure gereinigtes Gesamtmolekül (H + L; Dianova)
Alexa <sup>TM</sup> 488 $\alpha$ -Maus IgG	Alexa <sup>TM</sup> 488 Antikörper gegen Maus IgGs aus Ziege (H + L; F(ab') <sub>2</sub> Fragment; Molecular Probes)

## 2.5 Kommerzielle Systeme

Folgende kommerzielle Systeme wurden verwendet:

Bezeichnung	Hersteller
Protein Assay	BioRad
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce
Plasmid Purification Mini, Midi und Maxi Kit	Qiagen
Agarose Gel Extraction Kit	5Prime
Reverse Transkription System	Promega
Yeast Plasmid Preparation Kit Zymo	Research
TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega
Dual-Luciferase Assay System	Promega

## 2.6 Enzyme, Reagenzien und Verbrauchsmaterial

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

## 2.7 Größen- und Molekulargewichtstandards

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Molekülen in Agarosegelen wurden die *100 bp DNA Ladder* und die *1 kb DNA ladder* (New England BioLabs) verwendet. Für die Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen bei der SDS-Gelelektrophorese wurde der *Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Plus* (Fermentas) benutzt.

## 2.8 Versuchstiere

Transformationsversuche (s. 3.3.6) wurden in BRK-Zellen durchgeführt. Die Nieren hierfür wurden aus 3-5 Tage alten CD-Ratten (Charles River, Kißlegg) entnommen.

## 2.9 Software und Datenbanken

Texte und Tabellen dieser Arbeit wurden mit T<sub>E</sub>XnicCenter auf einem PC erstellt und mit Hilfe der Windows-Applikation MikT<sub>E</sub>X 2.8 von L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X in eine Adobe-Reader-Datei umgewandelt. Zeichnungen, Diagramme und Abbildungen wurden mit den Programmen Adobe Photoshop CS4 und Adobe Illustrator CS4 (Adobe Systems Incorporated) angefertigt. Sequenzvergleiche

wurden mit dem Programm BioEdit 4.8.5 sowie der *CLC Workbench* erzeugt. Für die Quantifizierung der Bandenintensität in Agarosegelen oder auf Röntgenfilmen wurde die Software Gene Tools des G-Box Systems (SynGene) verwendet. Zur Archivierung der verwendeten Antikörper, Plasmide, Vektoren, Oligonukleotide und Adenovirusmutanten wurde die Software *File Maker Pro 8.0* verwendet. Für die Literatursuche wurde die MEDLINE-Datenbank (National Library of Medicine) unter <http://www.ncbi.nlm.gov/PubMed/> benutzt. Die Literaturangaben in dieser Arbeit wurden mit EndNote 9 zusammengestellt, mit JabRef 2.6 in ein L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X-Format umgewandelt und ins T<sub>E</sub>XnicCenter-Dokument eingebunden.

Für die Identifikation von potentiellen Protein-Interaktionspartnern wurde mit Hilfe des Programms *NCBI Blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) eine gefundene DNA Sequenz gegen eine Datenbank mit DNA Sequenzen bekannter Proteine verglichen.

---

## 3 Methoden

### 3.1 Bakterien

#### 3.1.1 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 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. Nach Übernachtinkubation konnten dann Einzelkolonien isoliert werden. Diese Plattenkulturen sind mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging) verschlossen für 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, 10 min; Kühlzentrifuge 5417 R, Eppendorf GmbH). Das entstandene Pellet wurde in 0,5 ml LB-Medium resuspendiert und in CryoTubes™(Sarstedt) mit 0,5 ml sterilem Glycerin vermischt. Diese Dauerkulturen sind nahezu unbegrenzt bei -80 °C haltbar.

**LB-Medium:**

10 g/l Bacto Trypton  
5 g/l Bacto Hefeextrakt  
10 g/l NaCl  
pH 7 mit NaOH,  
autoklavieren

**Ampicillin (500x):**

50 mg/ml Ampicillin  
sterilfiltrieren,  
bei -20 °C lagern

#### 3.1.2 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurde zunächst eine Übernachtkultur in LB-Medium ohne Antibiotika angesetzt. Diese wurde am nächsten Tag 1:100 in neuem Medium verdünnt und bei 220 UpM in einem Inkubationsschüttler (New Brunswick) inkubiert, bis die Suspension eine OD<sub>600</sub> von 0,3-0,5 (Optimum 0,43) erreicht hatte. Die Bakterienkultur wurde nun 15 min in Eiswasser abgekühlt und in sterilen Behältern abzentrifugiert (3000 UpM,

5 min, 4 °C; Megafuge 1.0, Heraeus). Das Bakterienpellet wurde nun in TFBI Puffer (15 ml pro 50 ml Kultur) resuspendiert und 60-90 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde erneut wie oben zentrifugiert und das Pellet nun in TFBII resuspendiert (1 ml pro 50 ml Kultur). Die Bakteriensuspension wurde nun sofort in vorgekühlten 1,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert (je 100 µl) und diese sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die chemisch kompetenten Bakterien wurden bei -80 °C gelagert. Zur Bestimmung der Transformationsrate wurden die Bakterien mit 0,1 und 1 ng pcDNA3 transformiert (s. 3.1.3). Es sollten  $10^6$ - $10^8$  Transformanden pro µg DNA erreicht werden.

**TFBI:**

15%	Glyzerin
10 mM	CaCl <sub>2</sub>
30 mM	KOAc
100 mM	RbCl <sub>2</sub>
50 mM	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O
	pH 5,8 mit CH <sub>3</sub> COOH
	sterilfiltrieren, bei 4°C lagern

**TFBII:**

15%	Glyzerin
10 mM	MOPS, pH 7
75 mM	CaCl <sub>2</sub>
10 mM	RbCl <sub>2</sub>
	sterilfiltrieren, bei 4°C lagern

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

Zur Transformation wurden chemisch-kompetente DH5- $\alpha$  (s. 3.1.2) oder superkompetente XL2-Blue (Stratagene) *E. coli* Stämme verwendet. Die Bakterien wurden zunächst auf Eis aufgetaut und ein Aliquot von 50-100 µl in vorgekühlte Polypropylen Röhrrchen transferiert, mit 2 µl  $\beta$ -Mercaptoethanol (1,22 M) sowie 1-10 µl Plasmid-DNA vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 s wurden die Bakterien 2 min auf Eis abgekühlt und danach mit 1 ml auf 37 °C vorgewärmtem NZCYM- Medium versetzt. Die Bakterien wurden dann 1 h bei 37 °C und 220 UpM im Inkubationsschüttler (New Brunswick) regeneriert, kurz abzentrifugiert (4000 UpM, 3 min; Kühlzentrifuge 5417 R, Eppendorf GmbH) und in 50 µl LB-Medium resuspendiert. Anschließend wurde der Ansatz auf LB-Agarplatten mit geeigneten Antibiotika ausplattiert.

**NZCYM:**

10 g/l	NZ Amin
0,5 g/l	NaCl
0,2 g/l	Hefeextrakt
0,2 g/l	MgSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O
1 g/l	Casaminosäuren
	pH 7,5 mit NaOH,
	autoklavieren

## 3.2 Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-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-Bindedomäne (GAL4 DNA-BD) bindet dabei direkt an den GAL4 Promotor, während die C-terminale Aktivierungsdomäne (GAL4 AD) die Transkription des Gens aktiviert. Die beiden Domänen sind einzeln nicht funktionsfähig, müssen jedoch nicht kovalent verbunden sein. Die räumliche Nähe der Domänen zueinander reicht aus, um die Funktion als Transkriptionsfaktor sicherzustellen. 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).

Das in dieser Arbeit verwendete System basiert im Wesentlichen auf dem Matchmaker Two-Hybrid System 3 (Clontech). In den verwendeten Hefestämmen wurden rekombinante Proteine mit jeweils einer der beiden Domänen des GAL4 Transkriptionsfaktors expremiert. Zum einen war dies ein Fusionsprotein aus dem Suchprotein (hier die Onkodomäne von E4orf6) mit der DNA-Bindedomäne, zum anderen die Aktivierungsdomäne fusioniert mit Proteinen einer cDNA Bibliothek. Es wurde auf Hefezellen selektioniert, die jeweils beide Konstrukte exprimieren. Um nun interagierende Proteine zu finden, wurde zusätzlich auf Zellen selektioniert, in denen die beiden Fusionsproteine eine aktivierende Funktion haben. Hierfür wurde primär eine Wachstumsselektion durchgeführt. Die verwendeten Hefestämme besitzen einen Defekt in einem essentiellen Gen (z. B. Histidin) und können auf Selektionsmedium (ohne Histidin) nur wachsen, wenn durch Aktivierung durch das GAL4-Hybrid das Reporter-gen (z. B. Histidin) expremiert wird. Zur besseren Identifikation positiver Zellen, wird als weiteres Reporter-gen z. B. das *lacZ* Gen genutzt, das zur Blau-Weiß-Selektion verwendet wird.

### 3.2.1 Screening einer B-Zell cDNA Bibliothek

Für einen Screening Ansatz erfolgte zunächst, wie in 3.2.2 beschrieben, die Transformation der Hefezellen mit dem für das Suchprotein kodierenden Plasmid (E4orf6 Onkodomäne); die Hefezellen wurden auf Platten ohne Tryptophan (W-) selektioniert. Zum Test der Autoaktivierung wurde ein  $\beta$ -Galaktosidase Test durchgeführt (s. 3.2.3). Anschließend wurden die bereits transformierten Zellen mit einer Plasmid-basierten humanen B-Zell-Genbank (Durfee *et al.*, 1993) transformiert, die Zellen jedoch in diesem Fall auf Platten ohne Histidin, Tryptophan und Leucin (HWL-) ausgekugelt und 1-2 Wochen bei 30 °C inkubiert. Die erhaltenen Kolonien wurden in einem  $\beta$ -Galaktosidase Test auf Reporter-genexpression getestet. Aus den positiven Klonen wurde Plasmid DNA isoliert und diese durch Restriktionsspaltung (s. 3.6.8.1) mit *XhoI*, Sequenzierung und *NCBI Blast* weiter analysiert.

### 3.2.2 Transformation von Hefezellen

Die Hefezellen wurden mittels Lithiuacetatmethode transformiert. Hierfür wurden die Hefezellen zunächst über Nacht bei 30 °C und 150-220 UpM in einem Inkubationsschüttler (New Brunswick) in 10 ml YPAD-Vollmedium angezchtet. Nach Erreichen der stationären Phase (OD<sub>600</sub> von 10) wurde die Hefesuspension in 300 ml YPAD-Medium überführt und weitere

5-7 h unter Schütteln inkubiert, bis eine  $OD_{600}$  von 0,7 bis 0,9 erreicht war. Nach Zentrifugation (2000 UpM, 5 min; Multifuge 3S-R, Heraeus) wurden die Zellen in 10 ml  $H_2O_{bid}$  resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, anschließend wurde einmal mit 20 ml LiAc-Lösung gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in 1 ml LiAc-Lösung resuspendiert und 100  $\mu$ l davon für die Transformation verwendet. Zu den Zellen wurden 2-5  $\mu$ g Plasmid DNA sowie 100  $\mu$ g Carrier-DNA (gescherte Heringsperma-DNA) und 600  $\mu$ l Polyethylenglykol-Lithiumacetat-Lösung (PEG/LiAc) gegeben. Die Suspension wurde für 45 min bei 30 °C und 200 UpM inkubiert, anschließend mit 70  $\mu$ l DMSO versetzt und weitere 15 min bei 45 °C (Hitzeschock) inkubiert. Nach Zentrifugation (4000 UpM, 5 min; Kühlzentrifuge 5417R, Eppendorf GmbH) wurden die Hefezellen in 200  $\mu$ l  $H_2O_{bid}$  aufgenommen und auf den jeweiligen Selektionsplatten ausgekugelt (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) (Golemis und Khazak, 1997). Die Platten wurden bei 30 °C inkubiert.

**YAPD-Medium:**

10 g/l	Bacto Yeast Extrakt
20 g/l	Bacto Pepton, autoklavieren
50 ml/l	Glukose Lösung (20%)

**Glukose Lösung:**

20%	Glukose (w/v), sterilfiltrieren
-----	------------------------------------

**10x Lithiumacetat Lsg.**

1 M	Lithiumacetat pH 8,5, sterilfiltrieren
-----	--

**PEG/LiAc Lsg.:**

50%	Polyethylenglycol (w/v)
1 M	Lithiumacetat, sterilfiltrieren

**200x Histidin Lsg.:**

4,8 g/l	Histidin, sterilfiltrieren
---------	-------------------------------

**200x Leucin Lsg.:**

14,4 g/l	Leucin, sterilfiltrieren
----------	-----------------------------

**200x Tryptophan Lsg.:**

9,6 g/l	Tryptophan, sterilfiltrieren
---------	---------------------------------

**100x Uracil Lsg.:**

2,4 g/l	Uracil, sterilfiltrieren
---------	-----------------------------

**20x Aminosäuren HWL -:**

1 g/l	Adenin
0,48 g/l	Arginin
2,4 g/l	Asparagin
2,4 g/l	Glutamin
0,72 g/l	Isoleucin
0,72 g/l	Lysin
0,48 g/l	Methionin
1,2 g/l	Phenylalanin
8,8 g/l	Serin
4,8 g/l	Threonin
0,72 g/l	Tyrosin
3,6 g/l	Valin

**Plattenmedium HWL -:**

10%	<i>yeast nitrogen base</i> 10x (v/v)
10%	Glukose (v/v)
5%	Aminosäuren HWL - 20x (v/v)
1%	Uracil 100x (v/v)
20 g/l	Bacto Agar, sterilfiltrieren

### 3.2.3 $\beta$ -Galaktosidase Test

Um die Expression des Reportergens *lacZ* in den transformierten Hefezellen zu testen, wurde ein  $\beta$ -Galaktosidase Filter Lift Test durchgeführt. Das *lacZ* Gen kodiert für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase, welches das farblose Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) zu 5-Brom-4-chlorindol umsetzen kann, welches wiederum nach Oxidation einen blauen Indigokomplex bildet.

Zunächst wurden die zu testenden, vorher transformierten und durch Wachstumsselektion auf HWL-Platten selektionierten, Hefezellen auf frischen Platten ausgestrichen und bei 30 °C inkubiert, bis Hefekolonien gewachsen sind. Auf diese Platten wurde eine Nylon-Membran gedrückt, um die Hefezellen auf die Membran zu übertragen. Die Zellen auf der Membran wurden nun durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff und anschließendes Auftauen bei RT aufgebrochen. Die Membran wurde daraufhin mit der Zell-tragenden Seite nach oben in 750  $\mu$ l einer X-Gal-Lösung gelegt. Nach Inkubation bei 30 °C für etwa 60 min wurde die Membran auf Blaufärbung analysiert.

**Z-Puffer:**

60 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
40 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O
10 mM	KCl
1 mM	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
	pH 7,
	autoklavieren

**X-Gal Lösung:**

100 ml	Puffer Z
270 $\mu$ l	$\beta$ -Mercaptoethanol
1,67 ml	X-Gal in DMF (20 mg/ml)

## 3.3 Säugerzellen

### 3.3.1 Kultivierung von etablierten Zelllinien

Adhärenente Zellen wurden als Einschichtkulturen in Kulturschalen (Falcon / Sarstedt) kultiviert. Als Nährmedium diente Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit 0,11 g/l Natriumpyruvat (DMEM; Gibco BRL; Dulbecco *et al.*,1959). Das Medium wurde entweder mit 5% oder 10% fötalem Kälberserum (FKS; Pan) oder mit 5% oder 10% Kälberserum (NKS; 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 (BBD 6220; Heraeus) mit 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert und regelmäßig mit frischem Medium versorgt. Alle drei bis fünf Tage (abhängig von der Zelldichte) wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 bis 1:20 subkultiviert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die adhärenenten 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 Serum angereichertem Medium wurden die abgelösten Zellen in einem 15 ml oder 50 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) abzentrifugiert (2000 UpM, 3 min; Multifuge 3S-R, Thermo). Der Überstand wurde anschließend abgesaugt und das Zellpellet in DMEM resuspendiert. Danach wurden die Zellen in einem ge-

eigneten Verhältnis auf neue Kulturgefäße verteilt, die bereits vorgewärmtes Medium mit dem entsprechenden Serum sowie Antibiotika enthielten.

**PBS:**

140 mM NaCl  
3 mM KCl  
4 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
pH 7,4 mit HCl,  
autoklavieren

### 3.3.2 Lagerung von Säugerzellen

Für die dauerhafte Lagerung von Säugerzellen wurden zunächst subkonfluente Zellen nach vorheriger Ablösung durch Trypsin / EDTA (s. 3.3.1) zentrifugiert (2000 UpM, 3 min; Multifuge 3S-R, Thermo) und das Zellsediment in 1 ml FKS oder NKS (PAN) mit 10% DMSO (Sigma) aufgenommen und in CryoTubes™ (Sarstedt) überführt. Die Kühlung der Zellen erfolgte mit Hilfe des Cryo-Einfriergeräts „Mr. Frosty“ (Zefa Laborservice) nach Angaben des Herstellers. Zur Reaktivierung wurden die tiefgefrorenen Zellen rasch bei 37 °C erwärmt und die Zellsuspension in einer Kulturschale mit vorgewärmtem Medium bei 37 °C inkubiert. Um vorhandenes DMSO zu entfernen, wurde nach dem Absetzen der Zellen auf dem Schalenboden (nach 4-5 h) das vorhandene Medium ersetzt und die Zellen weiter kultiviert.

### 3.3.3 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden zunächst die Zellen mit Trypsin von den Kulturschalen gelöst (s. 3.3.1) und je nach Zelldichte in geeignetem Volumen DMEM Medium aufgenommen. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurde ein 50 µl Aliquot der Zellsuspension mit 1 Vol. Trypanblau-Lösung versetzt und einige Tropfen des Gemisches in eine Zählkammer (Neubauer) überführt. Im Lichtmikroskop (Leica DM IL) wurden die Zellen aus 16 Kleinquadranten des kammereigenen Rasters ausgezählt und unter Berücksichtigung der Verdünnung und Multiplikation der Zellzahl mit dem Faktor  $2 \cdot 10^4$  die Anzahl der Zellen pro ml Gesamtkultur ermittelt.

**Trypanblau-Lösung:**

0,5% Trypanblau  
0,85% NaCl

### 3.3.4 Transfektion von Säugerzellen

#### 3.3.4.1 PEI-Methode

Polyethylenimin (PEI, 25 kDa; Polysciences) ist ein polykationisches Polymer, das durch elektrostatische Wechselwirkung mit der anionischen DNA einen PEI / DNA-Komplex ausbilden

kann. Dieser Komplex mit positiv geladener Oberfläche ist in der Lage, an die negativ geladene Zelloberfläche zu binden und durch Endozytose ins Zellinnere zu gelangen.

Das PEI-Pulver wurde in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$  gelöst. Die Lösung mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml wurde anschließend mit 0,1 M HCl auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt, durch einen Filter (Porengröße 0,45  $\mu\text{m}$ ; Millipore) sterilfiltriert und anschließend bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Adhärenz Säugetierzellen wurden in Zellkulturschalen ausgesät und in Vollmedium (DMEM, 5% Serum, 1% Penicillin / Streptomycin) kultiviert. Zur Transfektion wurde die zu transfizierende DNA mit PEI gemischt (1:10) und in 1 ml DMEM ohne Zusätze resuspendiert. Nach 20-minütiger Inkubation bei RT, in denen sich die PEI / DNA-Komplexe bilden können, wurde das Transfektionsgemisch zu den Zellen gegeben, deren Nährmedium kurz zuvor durch DMEM mit 5% Serum ohne Antibiotikum ersetzt worden ist. Nach 6-8 h wurde das Medium durch Vollmedium ersetzt (DMEM, 5% Serum, 1% Penicillin / Streptomycin). Die transfizierten Zellen wurden nach 24-72 h geerntet (s. 3.3.5).

#### 3.3.4.2 Liposomen-Methode

Um sehr große DNA-Mengen oder große DNA-Moleküle (z. B. Bakmide) in eukaryotische Zellen zu transfizieren wurde das Lipofectamin-Transfektionssystem von Invitrogen benutzt (*Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 reagent*). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Anlagerung von positiv geladenen kationischen Lipiden zu Liposomen oder kleinen Vesikeln, welche die negativ geladene DNA umschließen. Diese Lipid-DNA-Komplexe fusionieren anschließend mit der Zellmembran und ermöglichen somit den Transport der DNA in die Zellen.

24 h vor der Transfektion wurden adhärenz Zellen in einer 6-well Schale oder 100 mm Zellkulturschalen ausgesät und mit Vollmedium (DMEM, 10% Serum, 1% Penicillin / Streptomycin) kultiviert. Die Zellen waren am nächsten Tag zu 60–80% konfluent und wurden nach Angaben des Herstellers transfiziert.

#### 3.3.5 Ernte von Säugetierzellen

Für die Zellernte wurden die Zellen im Medium mit Hilfe eines Plastikschabers (Sarstedt) vom Boden der Zellkulturschale abgeschabt, in ein geeignetes Reaktionsgefäß überführt und bei Raumtemperatur zentrifugiert (3 min, 2000 UpM; Multifuge 3S-R, Thermo). Es folgte ein Waschschrift mit 10 ml PBS und anschließender erneuter Zentrifugation. Das erhaltene Zellpellet wurde entweder bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

#### 3.3.6 Gewinnung und Kultivierung von primären Rattennierenzellen

Zur Gewinnung primärer Rattennierenzellen wurden die Nieren von 3-5 Tage alten CD-Ratten (Charles River) unter semisterilen Bedingungen entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in einem 50 ml Reaktionsgefäß mit sterilem PBS bei RT aufbewahrt. Die Nieren wurden dann unter sterilen Bedingungen mit Pinzette und Skalpell in einer Zellkulturschale mit sterilem

PBS zerkleinert und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Je 20 Nieren wurden in 20 ml sterilem PBS mit 1 mg/ml Kollagenase / Dispase (Roche) bei 37 °C für 3-4 h unter mehrmaligem Schütteln im Brutschrank inkubiert. Nach Zentrifugation (2000 UpM, 10 min, 4 °C; Multifuge 3S-R, Thermo) wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet zweimal mit je 20 ml sterilem PBS gewaschen und in DMEM-Medium resuspendiert. Schließlich wurden pro 150 mm-Zellkulturschale die Zellen von je vier Nieren in vorgewärmtem Medium mit 10% FKS ausgesät und im CO<sub>2</sub>-Brutschrank (Heraeus) in 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt und die Zellen, wie unter 3.3.1 beschrieben, weiter kultiviert.

### 3.3.7 Transformation primärer Rattennierenzellen

Um die Onkogenität von adenoviralen Proteinen in Nagerzellen zu testen, wurden  $2 \cdot 10^6$  primäre Rattennierenzellen, die zwei Tage vor Versuchsbeginn isoliert wurden (s. 3.3.6), auf 100 mm-Zellkulturschalen mit Vollmedium (DMEM, 10% FKS, 1% Penicillin / Streptomycin) ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen, wie unter 3.3.4.1 beschrieben, transfiziert. Einmal wöchentlich wurde das Medium durch neues Vollmedium ersetzt. Nach etwa drei Wochen starben die meisten nicht transfizierten Zellen ab, wohingegen Zellen, in denen die adenoviralen Genprodukte exprimiert wurden, zu mehrschichtigen Zellkolonien (*Foci*) auswuchsen. Diese konnten mit einer Kristallviolett-Färbelösung gefärbt und anschließend ausgezählt werden. Dabei bildet die Anzahl der *Foci* das Maß für die Effizienz, mit der zelluläre und virale Onkogene den Transformationprozess initiieren können.

#### **Kristallviolett-Lösung:**

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

### 3.3.8 Herstellung stabiler *knock down* Zelllinien

In dieser Arbeit wurden stabile Zelllinien aus humanen H1299 Zellen generiert. Unter Verwendung des pSuper RNAi System™ (OligoEngine) wurden nach Herstellerangaben Plasmide hergestellt, die auf dem Vektor pSuper basierend, eine shRNA gegen das humane HoxB7 Protein exprimieren. Die shRNA wurde gegen die Nukleotidsequenz 5'GAG CCG AGT TCC TTC-AAC A 3' auf dem kodierenden DNA-Strang an Nukleotidposition nt 240-259 von HoxB7 generiert. Wie unter 3.4.1 beschrieben, wurden mit dem shHoxB7 Plasmid sowie dem leeren pSuper Vektor als Kontrolle, als Expressionsplasmide sowie den Verpackungsplasmiden lentivirale Partikel hergestellt (s. 3.4.1).

Mit unterschiedlichen Mengen dieser Viruslösung ( $5 \cdot 10^8$ ,  $3 \cdot 10^9$ ,  $5 \cdot 10^9$  lentivirale Partikel) wurden H1299 Zellen in 150 mm-Kulturschalen transduziert (s. 3.4.3). 48 h nach der Transduktion wurde den Zellen Puromycin (0,5 µg/ml Medium; Sigma) zugesetzt. Alle 3-4 Tage wurde das Nährmedium mit zugesetztem Puromycin gewechselt, um die Selektion der stabil transfizierten Zellklone zu unterstützen. Nach etwa 2-4 Wochen konnten monoklonale Zellklone isoliert werden. Hierfür wurde das Medium entfernt, die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und

die zu isolierenden Zellklone mit einem sterilen Glaszylinder (Durchmesser 5 mm; Nunc) umschlossen. Dieser wurde zuvor mit der Unterseite in sterile Vaseline getaucht und auf diese Weise flüssigkeitsdicht auf die zu isolierenden Zellklone gesetzt. In die Glaszylinder wurde dann 50 µl Trypsin / EDTA-Lösung (PAA) pipettiert. Nach einigen Minuten konnten die abgelösten Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt werden, in die 50 µl Vollmedium (DMEM, 10% FKS, 1% Penicillin / Streptomycin) vorgelegt worden waren. Nach anschließender Zentrifugation (2000 UpM, 3 min; Kühlzentrifuge 5417 R, Eppendorf GmbH) wurden die Zellen in geeigneten Zellkulturschalen kultiviert (s. 3.3.1) und als Zelllinien etabliert.

## 3.4 Lentiviren

### 3.4.1 Herstellung und Lagerung rekombinanter lentiviraler Partikel

Bei den in dieser Arbeit verwendeten lentiviralen Vektoren wurden alle für die viralen Strukturproteine kodierenden Regionen aus dem Genom entfernt (replikationsinkompetent), so dass der Vektor selbst keine viralen Proteine bilden kann. Die Herstellung der lentiviralen Partikel erfolgte mit Hilfe der Zelllinie HEK293T, die mit dem jeweiligen, das Fremdgen tragenden, Expressionsplasmid (pSuper, pSuper-shHoxB7) sowie den für die Verpackung erforderlichen Plasmiden pCMV-VSV-G, pMDLg/pRRE und pRSV-Rev kotransfiziert wurde. pMDLg/pRRE ist ein Plasmid mit den vom *Human Immunodeficiency Virus-1* (HIV-1) abgeleiteten Genen *gag* (kodiert für die Nukleokapsidbestandteile p7, p17 und p24) und *pol* (kodiert für Reverse Transkriptase, Integrase und Protease) und gewährleistet somit die Verpackung der lentiviralen Partikel. pCMV-VSV-G ist ein Plasmid, das sich von VSV ableitet und für das Glykoprotein der VSV-Hülle kodiert. Dieses so genannte G-Protein ermöglicht eine spezies- und gewebsübergreifende Infektion von Zellen (Beyer *et al.*, 2002). Das Plasmid pRSV-Rev kodiert für das Rev-Protein, das in einem Vektorsystem den RNA-Transport sicherstellt (Dull *et al.*, 1998). Zunächst wurden die HEK293T Zellen bis zu einer Konfluenz von etwa 50% auf 150 mm-Zellkulturschalen in DMEM mit 5% FKS und 1% Penicillin / Streptomycin kultiviert. Vor der Transfektion wurde 1 ml Opti-MEM (GIBCO) in einem Reaktionsgefäß mit 7,5 µg des entsprechenden Expressionsplasmids, 2 µg pCMV-VSV-G, 3,8 µg pMDLg/pRRE, 2 µg pRSV-Rev sowie 90 µl PEI (Stammlösung 1 mg/ml, pH 7,2) gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bevor das DNA-PEI Gemisch zu den zu transfizierenden Zellen gegeben werden konnte, wurde das Kulturmedium durch 12,5 ml vorgewärmtes Opti-MEM ersetzt. Nach 6-8 h wurde das Medium gegen Vollmedium (DMEM, 5% FKS, 1% Penicillin / Streptomycin) mit 20 mM HEPES (pH 7,9) ersetzt. 48 h nach der Transfektion konnten die produzierten Viruspartikel, die von den Zellen ins Medium abgegeben worden sind, geerntet werden. Dazu wurde das Medium mit einer Spritze aufgezogen, steril filtriert (Porendurchmesser 0,45 µm), aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C aufbewahrt.

### 3.4.2 Titration von Lentiviren

Da die Lentiviren mit Expressionsplasmiden, die auf dem pSuper Plasmid basieren, kein fluoreszierendes Reportergen exprimieren, wurden sie mittels ELISA gegen das virale Kapsidantigen p24 titriert.

#### 3.4.2.1 P24 ELISA

Zur Titerbestimmung der Viruslösungen wurden zunächst 96-well Platten (NUNC, Immuno Plate, MaxiSorb Surface) bei RT über Nacht in einer feuchten Kammer mit dem Antikörper  $\alpha$ -CA 183 (NIH AIDS Research und Reference Reagent Program) gegen p24 beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Platten dreimal mit PBS-Tween (0,05% Tween 20) gewaschen und zur Blockierung unspezifischer Bindungen mit 10% NKS in PBS für zwei Stunden in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal mit PBS-T gewaschen. Die zu testenden Viruslösungen wurden zunächst mit 1/10 Vol. 5% Triton-X-100 inaktiviert, in PBS-T verdünnt (1:10 bis 1:10.000) und auf die Platten gegeben. Eine Lösung mit p24 definierter Konzentration diente als Standard, PBS-T alleine als Negativkontrolle. Die Inkubation erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei RT. Am folgenden Tag wurde die Platte erneut gewaschen und mit einem polyklonalen  $\alpha$ -p24 Antikörper (1:10.000 in 10%NKS in PBS-T) eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend gewaschen. Nun erfolgte eine einstündige Inkubation mit einem HRPO gekoppelten  $\alpha$ -Kaninchen Antikörper (Dianova). Nach erneutem Waschen mit PBS-T und H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> erfolgte die Zugabe des Substrates für die HRPO, Tetramethylbenzidin (TMB) in Natriumacetat für 5 min. Die Reaktion wurde mit 0,5 Vol. Schwefelsäure (0,5 M) gestoppt. Die Farbreaktion wurde mit dem VERSAmax™ Mikroplattenleser (Molecular Devices) bei einer Wellenlänge von 450-560 nm gemessen und die Mengen von p24 anhand des Standards bestimmt. Die Mengenabschätzung der lentiviralen Partikel erfolgte anhand der Menge von p24. Denn es gilt: 1 ng p24 entspricht etwa  $1,25 \cdot 10^7$  lentiviralen Partikeln. Und pro 100-1000 lentiviralen Partikeln ist 1 infektiöser Partikel.

#### **TMB Puffer:**

0,1 mg/ml TMB  
0,02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
100 mM NaAc, pH 6

### 3.4.3 Transduktion von Säugerzellen

Zur Transduktion von Säugerzellen mit lentiviralen Partikeln wurden sie in geeignetem Nährmedium bis zu einer Konfluenz von 50-70% in einer Zellkulturschale kultiviert. Unmittelbar vor der Infektion wurde das Medium gegen Infektionsmedium mit 8  $\mu$ g/ml Polybren ausgetauscht. Anschließend wurde die Lentivirussuspension zu den Zellen pipettiert. Nach 6-8 h wurde das virushaltige Medium gegen Vollmedium (DMEM, 5%FKS, 1% Penicillin / Streptomycin) ausgetauscht. Je nach Versuchsansatz wurden die Zellen nach 24-72 h geerntet oder weiter kultiviert.

## 3.5 Adenoviren

### 3.5.1 Herstellung von Viruspartikeln aus DNA

Mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *PacI* wurde der bakterielle Anteil von den adenoviralen DNA-Bakmiden entfernt. Die linearisierte DNA wurde mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 1 Vol. Isopropanol gefällt und je 8 µg gespaltene Bakmid-DNA pro 150 mm-Zellkulturschale in 2E2 Zellen nach der Liposomen-Methode (s. 3.3.4.2) transfiziert. Nach ca. 16 h im Brutschrank wurde das Medium gewechselt. Die transfizierten Zellen wurden so lange weiter kultiviert, bis sie sich von der Unterlage ablösten (jedoch maximal fünf Tage). Noch adhärente Zellen wurden mit einem Zellschaber abgeschabt, bei 2000 UpM für 5 min pelletiert (Multifuge 3S-R, Thermo), mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend in 5 ml DMEM ohne Zusätze durch viermaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C im Wasserbad lysiert und abermals zentrifugiert (4500 Upm, 10 min; Multifuge 3S-R, Thermo). Mit dem erhaltenen Überstand wurde erneut eine Zellkulturschale reinfiziert (3.5.4). Dieser Vorgang wurde so lange 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 wurden hochtitrige Virusstocks (s. 3.5.2) hergestellt.

### 3.5.2 Herstellung und Lagerung hochtitriger Virusstocks

Für die Gewinnung hochtitriger Virusstocks wurden mehrere 150 mm-Zellkulturschalen mit einer *moi* von 5 oder mit dem Überstand aus 3.5.1 infiziert. Drei bis fünf Tage nach Infektion war ein deutlicher zytopathischer Effekt sichtbar, das Medium verfärbte sich gelblich und die Zellen lösten sich von der Unterlage. Da 90% der produzierten Viren zellassoziiert bleiben, wurden die Zellen von der Unterlage abgelöst und 5 min bei 2000 Upm zentrifugiert (Multifuge 3S-R, Thermo). Das Pellet wurde in 5 ml PBS gewaschen und anschließend erneut zentrifugiert (2000 UpM, 5 min; Multifuge 3S-R, Thermo). Das Zellpellet, das man aus drei bis fünf 150 mm-Zellkulturschalen erhalten hatte, wurde in 4 ml DMEM ohne Zusätze resuspendiert und die Zellen durch viermaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C lysiert. Zur Entfernung der Zelltrümmer wurde 15 min bei 4500 UpM zentrifugiert (Multifuge 3S-R, Thermo). Anschließend wurde der Überstand abgenommen, mit 87%igem sterilem Glycerin (10% Endkonzentration; AppliChem) versetzt und titriert (s. 3.5.3). Diese Stocks können bei -80 °C aufbewahrt werden.

### 3.5.3 Titerbestimmung von Virusstocks

Der Titer der verwendeten Virusstocks wurde mit Hilfe von fluoreszenzbildenden Einheiten (*fluorescence forming unit*, FFU) bestimmt. Diese Methode konzentriert sich auf die frühen Infektionsereignisse, repräsentiert durch die immunhistochemische Bestimmung des frühen adenoviralen E2A-72K Proteins (DBP). Dazu wurden zunächst je  $4 \cdot 10^5$  W162-Zellen in 6-well Schalen (Sarstedt) ausgesät (s. 3.3.3). 24 h später wurde das Medium abgesaugt und mit

1 ml der Virusstockverdünnungen ( $10^{-3}$  bis  $10^{-6}$  in DMEM ohne Zusätze) infiziert. Die Zellen wurden dann 2 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank (BBD 6220; Heraeus) inkubiert, wobei alle 20 min vorsichtig geschwenkt wurde, um eine gleichmäßige Virusadsorption zu gewährleisten. Anschließend wurde in jede Vertiefung 1 ml Vollmedium (DMEM, 10% NKS, 1% Penicillin / Streptomycin) hinzugefügt und im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml / Vertiefung eiskaltem Methanol für 15 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  fixiert. Danach wurde der Alkohol abgesaugt und die Zellkulturschalen bei RT getrocknet. Um die Zellen für die nun folgende immunhistochemische Färbung permeabel zu machen, wurden sie mit 1 ml / Vertiefung PBS mit 0,5% Triton X-100 für 15 min bei RT inkubiert. Für die anschließende Färbung wurden die Zellen mit 2 ml / Vertiefung TBS-BG blockiert und 4 h bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit einer 1:10 Verdünnung des Antikörpers B6-8 in TBS-BG (1 ml / Vertiefung) inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit TBS-BG (2 ml / Vertiefung) für je 5 min gewaschen und mit je 1 ml / Vertiefung der zweiten Antikörperverdünnung (Alexa<sup>TM</sup>488 Anti-Maus; 1:1000 in TBS-BG) für 4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach wurde der Sekundärantikörper abgenommen, abermals dreimal 5 min mit TBS-BG gewaschen und mit 1 ml TBS-BG versetzt. Die so vorbereiteten Zellen konnten anschließend unter dem Immunfluoreszenzmikroskop (Leica DMIL) ausgezählt werden. Aus der pro Gesichtsfeld ermittelten Zahl infizierter Zellen konnte unter Berücksichtigung der Zellzahl und der Verdünnungsstufe auf die Zahl der infektiösen Partikel pro  $\mu\text{l}$  zurückgerechnet werden.

**TBS-BG:**

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

### 3.5.4 Infektion von Säugierzellen 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 10 und 200) mit dem geeigneten Volumen Medium (DMEM ohne Zusätze) gemischt und auf die Zellen gegeben. Für die Infektion einer 6-well Zellkulturschale benötigte man ein Gesamtvolumen von 1 ml; für 100 mm-Zellkulturschalen wurden 5 ml und für die Infektion einer 150 mm-großen Zellkulturschale wurden 12 ml Gesamtvolumen benötigt. Die Zellen wurden dann für 2 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und alle 20 min leicht geschwenkt, um eine gleichmäßige Adsorption der Viren zu ermöglichen. Anschließend wurde die Infektionslösung mit gleichem Volumen Vollmedium (DMEM mit 10% Serum und 1% Penicillin / Streptomycin) aufgefüllt. Die infizierten Zellen wurden je nach Versuchsansatz 4-72 h weiter inkubiert.

### 3.5.5 Bestimmung der Ausbeute an Virusnachkommen

Um die Anzahl der Nachkommenviren zu bestimmen, wurden Zellen (A549, H1299, Mio-M1, shHoxB7 bzw. pSuper) in 6-well Zellkulturschalen, wie unter 3.5.4 beschrieben, mit HAdV5 infiziert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. Dazu wurden die Zellen mit Hilfe eines Plastikspatels (Sarstedt) vom Boden der Kulturschale abgeschabt, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (2000 UpM, 3 min; Multifuge 3S-R, Thermo). Das Zellpellet wurde mit 1 ml sterilem PBS in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt) überführt und erneut zentrifugiert (2000 UpM, 4 min; Biofuge 13, Heraeus). Nun konnte das Pellet in 300-500 µl PBS resuspendiert und die Zellen durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C lysiert werden. Zur Entfernung der Zelltrümmer wurde 12 min bei 4500 UpM zentrifugiert (Biofuge, Heraeus). Der virushaltige Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und konnte bei 4 °C gelagert werden. Die Zahl der infektiösen Partikel im Überstand konnte, wie unter 3.5.3 angegeben, bestimmt werden. Aus dieser Zahl, der Verdünnung und der Anzahl der in dem Versuch eingesetzten Zellen konnte die Zahl der Nachkommenviren berechnet werden.

## 3.6 DNA Techniken

### 3.6.1 Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli*

Zur analytischen Isolierung kleiner Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde ein von Beck und Mitarbeiter modifiziertes Verfahren der alkalischen Lyse eingesetzt (Beck *et al.*, 1993). Dabei wurde eine 1,5 ml Übernachtskultur bei RT für 1 min bei 13.000 UpM (Kühlzentrifuge 5417 R, Eppendorf GmbH) abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 300 µl Lösung A resuspendiert. Die Suspension wurde dann mit 300 µl Lösung B versetzt, vorsichtig geschwenkt, 5 min bei RT inkubiert, 300 µl Lösung C zugegeben, erneut 5 min bei RT inkubiert und anschließend ebenfalls bei RT für 10 min, wie oben, zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt und die DNA 30 min bei 13.000 UpM gefällt. Der Überstand wurde abgesaugt und das DNA-Präzipitat mit 1 ml EtOH 75% gewaschen, getrocknet und in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> gelöst. Für die Präparation großer Mengen Plasmid DNA wurde das *Plasmid Purification Maxi Kit* (Quiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Die so isolierte DNA konnte für Restriktions- und Sequenzanalysen eingesetzt werden.

**Lösung A:**

50 mM Tris-HCl, pH 8  
10 mM EDTA  
100 µg/ml RNase A  
Lagerung bei 4 °C

**Lösung B:**

200 mM NaOH  
1% SDS (w/v)

**Lösung C:**

7,5 M NH<sub>4</sub>OAc  
Lagerung bei 4 °C

### 3.6.2 Präparation von Plasmid DNA aus Hefezellen

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus Hefe wurde das *Yeast Plasmid Preparation Kit* (Zymo) nach Herstellerangaben verwendet. Mit der gewonnenen DNA wurden *E. coli* Zellen transformiert (s. 3.1.3).

### 3.6.3 Präparation von genomischer DNA aus Säugerzellen

Zur Präparation genomischer DNA aus Säugerzellen wurden diese zunächst in 100 mm Kulturschalen im geeigneten Kulturmedium bis zur Konfluenz kultiviert. Nach Entfernung des Mediums und Waschen mit sterilem PBS wurden die Zellen trypsinisiert, in Kulturmedium aufgenommen und in einem 15 ml Reaktionsgefäß für 3 min bei 2000 UpM (Multifuge 3 S-R, Thermo) zentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit PBS gewaschen und konnte anschließend sofort verwendet oder bei -20 °C gelagert werden. Zum Aufschluss der Zellen wurden diese in 200 µl Extraktionspuffer resuspendiert und nachfolgend 1 h auf einem Überkopfschüttler (Reagenzglasrotator 3025; GFL) inkubiert. Zum Scheren der DNA wurden die Zelllysate mit Ultraschall (2x15 s, output 0,45-0,6 Impulse/s; Branson Sonifier 450) behandelt und danach 1 Vol. Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol beigefügt. Die Flüssigkeit wurde in ein Phase Lock Gel-Röhrchen (2 ml) überführt und durch fünfminütiges Schwenken homogenisiert. Zur Phasentrennung wurde das Gemisch bei Raumtemperatur für 5 min bei 13.000 UpM zentrifugiert (Kühlzentrifuge 5417 R, Eppendorf GmbH). Das Hinzufügen von organischem Lösungsmittel (Chloroform) sowie Homogenisierung und Zentrifugation wurden zweimal, wie oben, durchgeführt. Schließlich wurde die DNA in der oberen, wässrigen Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 0,7 Vol. Isopropanol und 0,07 Vol. 3 M Natriumazetat (pH 5,2) durch Zentrifugation bei Raumtemperatur für 15 min und 13.000 UpM ausgefällt (Kühlzentrifuge 5417 R, Eppendorf GmbH). Der Überstand wurde abgesaugt und das DNA-Präzipitat mit 1 ml EtOH 75% gewaschen, getrocknet und in 10 mM Tris/HCl (pH 8) aufgenommen.

#### **Extraktionspuffer:**

50 mM	Tris/HCl, pH 8
50 mM	NaCl
0,1%	SDS
0,1 mg/ml	Proteinase K (frisch zugesetzt)
0,1 mg/ml	RNAse H (frisch zugesetzt)

### 3.6.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde mit Hilfe des NanoDrop1000 Spektrophotometers (Thermo Scientific) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die zu analysierende DNA-Lösung wurde auf die Messplattform pipettiert und ein UV-Absorptionsspektrum über einen festgelegten Wellenlängenbereich aufgenommen. Die Reinheit der DNA wurde anhand des Verhältnisses OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> beurteilt, das 1,8 bis 2,0 betragen sollte.

### 3.6.5 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen beruht auf der unterschiedlichen Wandergeschwindigkeit der Nukleinsäuren im elektrischen Feld in Abhängigkeit von der Fragmentlänge. DNA-Proben wurden sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke in 0,6 bis 1,5%igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Dafür wurde eine entsprechende Menge Agarose (LE Agarose, Biozym) in 1x TBE- Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle (Siemens) gelöst. Zur späteren Detektion der DNA wurde die Agarose-Gellösung mit 0,5 bis 1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in eine Flachbettgelapparatur (Peqlab) gegossen. Die DNA-Proben wurden mit jeweils 1/6 Vol. Auftragspuffer versetzt und zusammen mit einem Größenstandard (*1 kb DNA Ladder* oder *100 bp DNA Ladder*, New England Biolabs) 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 zu minimieren, wurde der Lösung bei präparativen Gelen zusätzlich 1 mM Guanosin und 1 mM Magnesiumchlorid zugegeben.

**5x TBE:**

0,45 M	Tris
0,45 M	Borsäure
10 mM	EDTA
	pH 7,8 mit CH <sub>3</sub> COOH

**Auftragspuffer:**

0,25%	Bromphenolblau (w/v)
0,25%	Xylencyanol (w/v)
50%	Glyzerin (v/v)
2%	50x TAE (v/v)

### 3.6.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen erfolgte entweder mit Hilfe des *Agarose Gel Extract Kits* (5Prime) nach Angaben des Herstellers oder über ein alternatives Verfahren, das insbesondere für die Isolierung von Bakmid-DNA-Fragmenten herangezogen wurde. Dabei wurde ein Agaroseblock mit der zu präparierenden DNA-Bande zunächst unter langwelligem UV-Licht (365 nm) aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend für 2 h bei 10 °C und 20.000 UpM zentrifugiert (RC 5B Plus, Sorvall). Der DNA-haltige Überstand wurde dann mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 1 Vol. Isopropanol gefällt, das DNA-Pellet in 50 µl 10 M Tris/HCl pH 8,0 aufgenommen und die Konzentration und Qualität der isolierten DNA über erneute Agarose-Gelelektrophorese (s. 3.6.5) ermittelt.

### 3.6.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

#### 3.6.7.1 Standard PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) (Saiki *et al.*, 1988) ist ein Verfahren zur überexponentiellen Vermehrung (Amplifikation) definierter Nukleinsäurese-

quenzen *in vitro*, wobei die Spezifität der Reaktion durch die Wahl der zugesetzten Starter-Oligonukleotide (Primer) sichergestellt wird. Für einen 50 µl Standard-Reaktionsansatz wurden 50-100 ng DNA, je 100 pmol der entsprechenden Oligonukleotide, je 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP; New England Biolabs), 5 µl 10x PCR-Puffer (Omnilab) und 0,5 µl thermostabile Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl; Omnilab) eingesetzt. Dieser Ansatz wurde in dünnwandigen 0,2 ml Reaktionsgefäßen (Biozym) in einem FlexCycler (Analytic Jena) nacheinander wie folgt inkubiert: Aufschmelzen der DNA bei 95 °C für 0,5-1 min, Hybridisieren der Oligonukleotide an die Zielsequenz bei 55-70 °C für 0,5-1 min und Polymerisation bei 72 °C für 1 min pro kb. Dieser Zyklus wurde 20- bis 30-mal durchlaufen, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation bei 72 °C, um 3'-Enden nicht vollendeter PCR-Produkte aufzufüllen und im Anschluss daran auf 4 °C abgekühlt. 5 µl der so amplifizierten DNA wurden auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.6.5) und unter UV-Licht hinsichtlich ihrer Fragmentgröße und Menge mit dem G-Box System (Syngene) überprüft.

### 3.6.7.2 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 gelegen sein, welche mit einem GC-reichen Abschnitt beginnen und enden sollte. Die Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden von der Firma Metabion hergestellt und in die PCR zu einer Endkonzentration von 125 ng eingesetzt. Die Mutagenese wurde in 0,2 ml PCR Reaktionsgefäßen (Biozym) angesetzt. Der Mix bestand aus 5 µl des 10x Reaktionspuffers (Stratagene), jeweils 100 pmol des *forward* und *reverse* Primers, 1 µl dNTP-Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP; New England Biolabs) und dem DNA Fragment, in welches die Mutation eingeführt werden sollte. Der Ansatz wurde dann mit 1 µl Pfu UltraII 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 3 h bei 37 °C mit 1 µl des Restriktionsenzym DpnI (New England Biolabs) verdaut, um methylierte Elternstrang-DNA zu beseitigen. 5 µl der mutagenisierten DNA wurden auf einem Agarosegel elektrophoretisch (s. 3.6.5) 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* transformiert (s. 3.1.3).

### 3.6.7.3 Inverse PCR

Eine Inverse PCR zur Deletion von Sequenzabschnitten von Bakmiden wurde in 0,2 ml PCR Reaktionsgefäßen (Biozym) angesetzt. Der Mix bestand aus 5 µl des 10x Reaktionspuffers

(Stratagene), jeweils 200 pmol des forward und reverse Primers, 1  $\mu$ l dNTP-Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP; New England Biolabs) und 20 ng der Bakmid DNA. Der Ansatz wurde dann mit 1  $\mu$ l Pfu UltraII DNA-Polymerase (Stratagene) versetzt und mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$  auf ein Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l gebracht. Die PCR wurde in 30 Zyklen in einem FlexCycler (Analytic Jena) durchgeführt (Aufschmelzen der DNA bei 95 °C, Hybridisierung der Oligonukleotide an die Zielsequenz bei 62 °C und ein Polymerisationsschritt bei 72 °C). Im Anschluss wurde das PCR Produkt wie in 3.6.6 beschrieben aus dem Gelstück isoliert und die DNA Enden phosphoryliert. Hierfür wurde die DNA mit 2,5  $\mu$ l Kinasepuffer 10x, 2  $\mu$ l ATP (100  $\mu$ M) und 1  $\mu$ l Polynukleotidkinase gemischt und der Ansatz auf 250  $\mu$ l mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$  aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C für 40 min und wurde durch Abkühlen auf 4 °C gestoppt. Zu diesem Ansatz wurde nun 1  $\mu$ l T4-DNA Ligase gegeben und die Ligation, wie unter 3.6.8.2 beschrieben, durchgeführt.

#### 3.6.7.4 PCR zum Nachweis der Virusreplikation

Aus dem Gesamtzellextrakt infizierter Zellen wurden gleiche Mengen an Zelllysate (entsprechend der Proteinkonzentration) entnommen, mit Tween-20 (Endkonzentration 0,5%; Merck) und Proteinase K (Endkonzentration 100  $\mu$ g/ml; Invitrogen) versetzt und mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$  auf 24,5  $\mu$ l aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde nun 1 h im Heizblock (Eppendorf Thermomixer comfort) bei 55 °C inkubiert. Nach 10-minütiger Inaktivierung der Proteinase K bei 99 °C wurde eine Standard-PCR (Denaturierung: 30 s bei 95 °C, Hybridisierung: 1 min bei 55 °C und Polymerisation: 2 min bei 72 °C) mit 20 Zyklen durchgeführt. Als Primer dienten die zwei Oligonukleotide E1B bp20-43 fwd (Nr. 64) und E1B 361-389 rev (Nr. 110), die ein 389 Bp langes Fragment aus dem AdV5 E1B-55K-Gen amplifizieren. Die PCR-Produkte wurden in einem 1%igen Agarosegel analysiert (s. 3.6.5) und mit Hilfe des G-Box Systems und der *Gene tools* Software (Syngene) densitometrisch ausgewertet.

### 3.6.8 Klonierung von DNA-Fragmenten

#### 3.6.8.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme

Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs bezogen und zusammen mit den dazugehörigen 10x Puffern nach den Vorgaben des Herstellers eingesetzt. Um Pufferunverträglichkeiten bei Spaltungen mit mehreren Enzymen zu umgehen, wurde die DNA gegebenenfalls nach jedem einzelnen Verdau mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 1 Vol. Isopropanol gefällt und erneut in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$  aufgenommen. Für analytische Spaltungen wurden in der Regel 0,5-1  $\mu$ g DNA sowie je 3-10 U Restriktionsenzym eingesetzt und 1 h 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 mindestens 2 h. Zu spaltende PCR-Produkte wurden nach der PCR-Reaktion zunächst über NaOAc / Isopropanolfällung von nicht-inkorporierten Oligonukleotiden und dNTPs gereinigt und konzentriert, bevor sie über Restriktionsenzymsspaltung für die Klonierung vorbereitet werden konnten. Nach der Spaltung wurden die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.6.5) und gegebenenfalls aus dem Gel gereinigt (s. 3.6.6).

### 3.6.8.2 Ligation

Durch Restriktionsendonukleasen gespaltene DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase miteinander verknüpft. Linearisierte Vektor-DNA wurde, um eine Religation des Vektors zu unterbinden, ggf. mit 1 U alkalischer Phosphatase für 30 min bei 37 °C dephosphoryliert und anschließend für 45 min bei 65 °C inkubiert. DNA-Fragmente mussten vor der Ligation, wie unter 3.6.6 beschrieben, aufgereinigt werden. Zusätzlich war die Abschätzung der Konzentrationen von Vektor und Fragment erforderlich. Ein Standard-Ligationsansatz (20 µl) enthielt 20-100 ng Vektor-DNA sowie die drei- bis zehnfache Menge an zu klonierender Fremd-DNA mit 10 µl 2x Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase (Roche). Für die kovalente Verknüpfung der Phosphodiesterbrücken wurde der Ansatz über Nacht bei 13 °C inkubiert und das rekombinante Plasmid anschließend zur Transformation in *E. coli* (s. 3.1.3) eingesetzt.

### 3.6.8.3 Identifizierung Rekombinanter Klone / Sequenzierung

Ausgehend von den transformierten *E. coli*, die auf LB-Agarplatten mit geeigneten Antibiotika wuchsen, wurden Einzelkolonien mit einer sterilen Pipettenspitze in LB-Flüssigmedium mit geeigneten Antibiotika überimpft und über Nacht bei 37 °C mit 220 UpM inkubiert. Plasmid-DNA wurde durch alkalische Lyse präpariert (s. 3.6.1) und ein Teil davon durch Spaltung mit geeigneten Restriktionsenzymen (s. 3.6.8.1) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese (s. 3.6.5) analysiert. Die so identifizierten rekombinanten Klone wurden durch DNA-Sequenzierung überprüft und als Glyzerinkultur (s. 3.1.1) aufbewahrt. Für die Sequenzierung wurden 300-600 ng Plasmid-DNA und 20 pmol eines entsprechenden Oligonukleotids mit H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> auf ein Endvolumen von 7 µl aufgefüllt. Die DNA-Sequenzierungen dieser Arbeit wurden von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt.

## 3.7 RNA Techniken

### 3.7.1 Vermeidung RNase induzierten RNA Abbaus

Ribonukleasen (RNasen) sind sehr stabile und aktive Enzyme, die selbst in geringen Konzentrationen und in kürzester Zeit RNA abbauen können. Um den Abbau der RNA zu vermeiden, wurden beim Arbeiten mit RNA spezielle Vorkehrungen getroffen. Gegenstände aus Glas und Metall wurden in einem Ofen für 12 h bei 160 °C gebacken, ein Vorgang der RNasen irreversibel denaturiert. Alle Chemikalien wurden in H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> gelöst und DEPC mit einer Endkonzentration von 0,1% (v/v) zugegeben, soweit das DEPC nicht mit den entsprechenden Reagenzien interferiert. Die DEPC-haltigen Lösungen wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und am nächsten Tag autoklaviert. Dabei reagiert das DEPC mit den Aminogruppen der RNasen und inaktiviert diese irreversibel. Durch das Erhitzen während des Autoklavierens zersetzt sich überschüssiges DEPC und stört nicht mehr in nachfolgenden Prozessen.

### 3.7.2 Präparation von RNA aus Säugerzellen

Die Isolierung von gesamt RNA aus Säugerzellen erfolgte mit TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers.

### 3.7.3 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration von isolierter RNA wurde mit Hilfe des NanoDrop1000 Spektrophotometers (Thermo Scientific) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die zu analysierende RNA-Lösung wurde auf die Messplattform pipettiert und ein UV-Absorptionsspektrum über einen festgelegten Wellenlängenbereich aufgenommen.

### 3.7.4 Quantitative *Real Time* PCR zur Ermittlung der mRNA Syntheserate

Die quantitative *Real Time* PCR ist, wie die herkömmliche PCR, eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, jedoch kann hier in Echtzeit die gewonnenen DNA quantifiziert werden. Um die Mengen bestimmter mRNAs in der Zelle zu bestimmen, musste diese zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Hierfür wurde 1 µl RNA mit dem Reverse Transkription System (Promega) nach Angaben des Herstellers revers transkribiert. Die *Real Time* PCR wurde mit dem Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Sciences) durchgeführt. Hierfür wurde die cDNA (1:10 Verdünnung) mit je 5 µM der entsprechenden Oligonukleotide und 5 µl *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) in 10 µl gemischt. Das Standard PCR-Programm war folgendes: 10 min bei 95 °C; 45 Zyklen 30 s bei 95 °C, 30 s bei 55 bis 62 °C (je nach eingesetztem Primer Set) und 30 s bei 72 °C. Der Ct-Wert wurde aus drei Messungen sowie dem Verhältnis der viralen RNA zu der zellulären 18S rRNA Menge ermittelt. Durch Schmelzkurvenanalyse wurde die Identität der PCR Produkte sichergestellt.

## 3.8 Protein Techniken

### 3.8.1 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Die Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* erfolgte als Fusionsprotein mit Gluthadion S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* (Smith und Johnson, 1988). Dabei ermöglicht der GST-Anteil eine rasche affinitätschromatographische Aufreinigung der Fusionsproteine mittels Gluthadion Sepharose. Das zu expremierende Fremdgen stand dabei unter der Kontrolle des *lac*-Promotors. Durch chemische Induktion mit dem Lactose-Analogen Isopropylthio-β-D-galactosid (IPTG) wird die Expression plasmidkodierter Gene induziert. Durch diese Expressionskontrolle können toxische Effekte der rekombinanten Genprodukte, die zu verringertem Zellwachstum und Instabilität der Expressionsvektoren führen, verhindert werden.

Zur Expression der rekombinanten Proteine wurde zunächst 2 ml einer Übernachtskultur

(s. 3.1.1) in 100 ml vorgewärmtem LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika verdünnt und bis zum Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,5-0,7 bei 220 UpM (New Brunswick) weiter geschüttelt. Zur Induktion wurde der Kultur nun IPTG mit einer Endkonzentration von 0,5 mM zugegeben und für weitere 2 h bei 30 °C inkubiert. Die induzierte Bakterienkultur wurde zentrifugiert (4000 UpM, 10 min, 4 °C; Megafuge 1.0, Heraeus), das Pellet in 5 ml Puffer I resuspendiert und erneut, wie oben, zentrifugiert. Das Pellet konnte bei -20 °C gelagert oder sofort weiter verwendet werden. Eingefrorene Proben wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Das Pellet wurde in 5 ml kaltem Puffer I resuspendiert, mit einer spatelspitze Lysozym versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden DTT mit einer Endkonzentration von 5mM und 10% N-Sacoyl zum Homogenisat gegeben und dieses 5 s gemischt. Nun wurde zweimal je 30 s mit Ultraschall (output 0,60; 0,8 Impulse/s; Branson Sonifier 450) behandelt und das Homogenisat schließlich abzentrifugiert (10.000 UpM, 10 min, 4 °C; Super T21, Sorvall). Der Überstand wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1,5 ml 10% Triton-X-100 versetzt und 5 s gemischt. Nun wurde die Suspension durch einen Sterilfilter mit 0,45 µm Porengröße gepresst. Die so aufgearbeitete Proteinsuspension wurde mit 100 µl 50% Glutathion Sepharose versetzt. Dafür mussten zunächst 1,33 ml der Glutathion Sepharose 4B (GE Helthcare) dreimal in kaltem TBS Puffer gewaschen und schließlich in 1 ml TBS aufgenommen werden. Diese 50% Glutathion Sepharose Lösung wurde mit der Proteinsuspension gemischt und für 1 h bei 4 °C über Kopf rotiert (Reagenzglasrotator 3025, GFL). Anschließend wurde das Pellet zentrifugiert (2100 UpM, 20 min, 4 °C; Megafuge 1.0; Hereaus), sechsmal in TBS mit zugesetzten Proteaseinhibitoren (PMSF 1 mM, Aprotinin 10 U/µl, Leupeptin 1 µg/µl, Pepstatin 1 µg/µl und DTT 1% (v/v)) gewaschen und schließlich in 100 µl TBS mit Proteaseinhibitoren aufgenommen. Die Proteinkonzentration und Qualität der aufgereinigten Proteine wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt (s. 3.8.5). Hierfür wurden 10 µl der gekoppelten Proteine mit 1 Vol. zweifach Lämmli versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert und in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt. Zur Abschätzung der Proteinkonzentration wurde ebenfalls eine Eichreihe mit definierten Mengen des Eichproteins BSA (Rinderserumalbumin) verwendet. Die Proteine im Gel wurden mit Coomassie-Färbung (s. 3.8.7.1) sichtbar gemacht.

**PufferI:**

10 mM	Tris-HCl
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA
	pH 8

### 3.8.2 *In vitro* Translation

Bei der *in vitro* Translation können große Mengen eines bestimmten Proteins, ausgehend von Plasmid DNA, exprimiert werden. In den meisten Fällen handelt es sich, wie in diesem Fall, um zellfreie Systeme. In dieser Arbeit wurde das TNT<sup>®</sup> Coupled Reticulocyte Lysate Systems (Promega) verwendet, welches Retikulozyten, noch nicht ausgereifte rote Blutkörperchen, zur Expression nutzt. Diese Zellform enthält keinen Kern, jedoch RNA und Zellorganellreste und sind reich an Ribosomen und ermöglicht damit eine effiziente Proteinexpression. Um das

gewünschte, so synthetisierte Protein später identifizieren zu können, wurde Methionin mit einem radioaktiven Schwefel-Isotop ( $[^{35}\text{S}]$ -Methionin) in die Translationsreaktion eingesetzt. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die Größe der exprimierten Proteine durch Auftrennung mit SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (s. 3.8.5) und anschließender Autoradiographie (s. 3.8.7.2) bestimmt.

### 3.8.3 Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Säugerzellen

Bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagerte Zellpellets wurden zunächst auf Eis aufgetaut, frisch geerntete Zellen wurden direkt in einer geeigneten Menge gekühltem RIPA-Lysepuffer mit zugesetzten Proteaseinhibitoren (PMSF 1 mM, Aprotinin 10 U/ $\mu\text{l}$ , Leupeptin 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , Pepstatin 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  und DTT 1% (v/v)) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Um einen vollständigen Zellaufschluss zu gewährleisten, wurden die Zellysate mit Ultraschall (40 s, output 0,45-0,6 Impulse/s; Branson Sonifier 450) behandelt, wobei die Reaktionsgefäße stets auf Eis gelagert wurden. Die Zellysate wurden anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäßen zentrifugiert (11.000 UpM, 3 min,  $4^\circ\text{C}$ ; Kühlzentrifuge 5417R, Eppendorf GmbH), um größere Zellfragmente abzutrennen. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für weitere Experimente verwendet.

#### **RIPA-Puffer:**

50 mM	Tris-HCl, pH 8
150 mM	NaCl
5 mM	EDTA
0,1%	SDS (w/v)
1%	NP40 (v/v)
0,5%	Natriumdeoxycholat (v/v)

### 3.8.4 Quantitative Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration löslicher Proteine einer Probe wurde mit Hilfe des Protein Assay (BioRad) ermittelt. Dieses Verfahren, das auf der Proteinquantifizierung nach Bradford beruht (Bradford, 1976), misst die Absorptionzunahme bei 595 nm, nachdem die vorliegenden Proteine an das chromogene Substrat dieses Testsystems gebunden haben. Die Proteinkonzentration einer Probe lässt sich durch den Vergleich der gemessenen  $\text{OD}_{595}$  mit den Werten einer Eichkurve ermitteln. 1  $\mu\text{l}$  der zu bestimmenden Proteinprobe und 1-16  $\mu\text{g}$  des Eichproteins BSA (Rinderserumalbumin) wurden in Polystyrol-Küvetten mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$  jeweils auf ein Gesamtvolumen von 800  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und nach Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Bradford-Färbereagenz kurz (3-5 min) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption bei 595 nm wurde schließlich photometrisch (SmartSpec Plus Spectrophotometer, BioRad) gegen einen Nullwert (800  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$  + 200  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz) bestimmt.

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

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine in Gegenwart eines hohen SDS-Überschusses elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dabei lagert sich das negativ geladene SDS in konstanten Gewichtsverhältnissen an die Proteine an und kompensiert deren positive Ladung so, dass die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine zur Anode allein durch deren Größe bestimmt wird. Die Qualität der Proteinauftrennung wird in diesem durch Laemmli etablierten Verfahren durch die Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems gesteigert, wobei die Proteine zunächst in einem niedrig prozentigen Sammelgel konzentriert werden und von dort gemeinsam in das Trenngel einwandern (Laemmli, 1970). Der Aufbau der verwendeten Gelapparaturen und das Gießen der Gele erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers (Biometra). 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 *et al.*, 1989) versetzt und 3 min im Heizblock (Thermomixer comfort, Eppendorf GmbH) bei 95 °C denaturiert. Bei der Analyse von E1B-55K und E4orf6 wurden die mit SDS-Probenpuffer versetzten Proteinlysate für 12 min bei 55 °C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 20 mA pro Gel in TGS-Puffer, bis die Bromphenolblau-Bande das Ende des Gels erreichte.

#### Sammelgel (5%)

17%	Acrylamid-Stammlösung (v/v)
120 mM	Tris/HCl, pH 6,8
0,1%	SDS (w/v)
0,1%	APS (w/v)
0,1%	TEMED (v/v)

#### Trenngel (12%)

40%	Acrylamid-Stammlösung (v/v)
250 mM	Tris/HCl, pH 8,8
0,1%	SDS (w/v)
0,1%	APS (w/v)
0,04%	TEMED (v/v)

#### 30% Acrylamid-Stammlösung:

29%	Acrylamid (w/v)
1%	N,N'Methylenbisacrylamid (w/v)

#### Trenngel (10%):

33%	Acrylamid-Stammlösung (v/v)
250 mM	Tris/HCl, pH 8,8
0,1%	SDS (w/v)
0,1%	APS (w/v)
0,04%	TEMED (v/v)

#### SDS-Probenpuffer:

100 mM	Tris/HCl, pH 6,8
4%	SDS (w/v)
200 mM	DTT
0,2%	Bromphenolblau (w/v)
20%	Glyzerin (v/v)

#### TGS-Puffer:

25 mM	Tris
200 mM	Glycin
0,1%	SDS (w/v)

### 3.8.6 Western Blot

Voraussetzung für den immunologischen Nachweis der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine ist deren Immobilisierung auf Nitrozellulose (Protran, Schleicher & Schuell) nach dem Western Blot-Verfahren. Der Transfer erfolgte mit Hilfe einer *Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (BioRad) nach Anleitung des Herstellers in Towbin-Puffer bei einer Stromstärke von

400 mA für 30-90 min, je nach Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins. Zum Überprüfen des Transfers konnten die Proteine auf der Membran mit Ponceau S (Sigma) reversibel angefärbt werden. Zum Entfärben wurde die Membran mit  $H_2O_{bid}$  gewaschen. Vor der Inkubation der Nitrozellulose mit einem spezifischen Antikörper wurden die freien Bindungsstellen der Membran durch Inkubation in PBS mit 5% Magermilchpulver (Glücksklee) für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C abgesättigt. Anschließend wurde die Membran gewaschen und in einer Lösung des spezifischen Primärantikörpers (verschiedene Verdünnungen in PBS-Tween mit oder ohne Milchpulverzugabe) für 4 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach der Bindung des primären Antikörpers wurde die Membran dreimal 10 min in PBS-Tween gewaschen und für 4 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in einer 1:10.000 Verdünnung eines HRPO-gekoppelten Sekundärantikörpers geschüttelt. Nach drei weiteren Waschschrritten mit PBS-Tween für je mindestens 10 min folgte die Inkubation der Nitrozellulosemembran mit dem chemilumineszenten Substrat für die HRPO-vermittelte Farbreaktion. Für den spezifischen Proteinnachweis wurde das SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) verwendet. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip der verstärkten Chemilumineszenz unter Beteiligung des Enzyms HRPO (Meerrettich 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 Emission, so dass eine maximale Intensität 5-20 min nach Einsetzen der Reaktion und eine anschließende Abnahme der Strahlung mit einer Halbwertszeit von 1 h zu beobachten sind. Hierfür wurden nach Abgießen des letzten Waschpuffers die beiden Detektionslösungen nach Angaben des Herstellers 1:1 gemischt und auf den Nitrozellulosefilter gegeben. Nach 5 min Inkubationszeit wurde der Filter in Folie eingeschlagen. Die autoradiographische Detektion des Signals fand während Expositionszeiten zwischen 3 sec und 40 min mit einem Röntgenfilm (CEA RP new, medical X-ray film; CEA RP new) statt. Der Film wurde anschließend mit Hilfe eines Entwicklungs- und Fixierautomaten (Kodak) entwickelt.

**Towbin Puffer:**

25 mM Tris-HCl, pH 8,3  
200 mM Glycin  
0,05% SDS (w/v)  
20% Methanol (v/v)

**Ponceau Lösung:**

0,2% Ponceau S (w/v)  
3% Trichloressigsäure (v/v)  
3% Sulfosalicylsäure (w/v)

**PBS-Tween:**

200 mM PBS  
0,1% Tween-20 (v/v)

### 3.8.7 Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen

#### 3.8.7.1 Coomassie Färbung

Zur Anfärbung von Proteinen in SDS-Gelen wurde entweder das SimplyBlue™ SafeStain Reagenz (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet oder die Proteine wurden durch Coomassie Färbung sichtbar gemacht. Hierfür wurde das SDS-Gel nach der Gelelektrophorese für 12 min in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$  geschüttelt und anschließend in Coomassie Lösung für mindestens 30 min inkubiert. Anschließend wurde das Gel dreimal 30 min in Entfärbelösung inkubiert.

**Coomassie Lösung:**

0,025%	Coomassie Brilliant Blue R250 (w/v)
40%	Methanol (v/v)
7%	$\text{CH}_3\text{COOH}$ (v/v)

**Entfärbelösung:**

40%	Methanol (v/v)
10%	$\text{CH}_3\text{COOH}$ (v/v)

#### 3.8.7.2 Autoradiographie von Polyacrylamidgelen

SDS-Polyacrylamidgele, auf denen radioaktiv markierte Proteine aufgetrennt wurden, wurden zunächst 30 min in Fixierlösung, anschließend 30 min mit Amplify-Lösung (GE Healthcare) und schließlich 5 min in Geltrocknungslösung unter Schütteln inkubiert. Das Gel wurde daraufhin auf Watman Papier (VWR) gelegt und auf einem Geltrockner (GD2000, Hoefer) bei 80 °C für 30 min getrocknet. Zur Detektion der radioaktiven Proteine wurde das getrocknete Gel mit einem Röntgenfilm (CEA RP new, medical X-ray film; CEA RP new) bei -80 °C 1-6 h exponiert und der Röntgenfilm anschließend mit Hilfe eines Entwicklungs- und Fixierautomaten (Kodak) entwickelt.

**Fixierlösung:**

50%	Methanol (v/v)
40%	$\text{CH}_3\text{COOH}$ (v/v)

**Geltrocknungslösung:**

7%	Methanol (v/v)
7%	$\text{CH}_3\text{COOH}$ (v/v)
1%	Glyzerin (v/v)

### 3.8.8 Nachweis von Protein-Protein Interaktionen

#### 3.8.8.1 G<sub>st</sub>-pull down

Für den Nachweis der Interaktion von Proteinen *in vitro* wurde ein GST-pull down Experiment durchgeführt. Dabei werden GST-Fusionsproteine mittels Gluthadion Sepharose immobilisiert und hieran bindende Proteine können kopräzipitiert werden. Um die Bindung eines zu untersuchenden Proteins an das GST-Fusionsprotein nicht durch viele weitere, in der Zelle vorhandene, Proteine zu beeinflussen, wurde ersteres mittels *in vitro* Translation hergestellt (s. 3.8.2).

Es wurden etwa 3-5 µg GST-Fusionsproteine (s. 3.8.1) zusammen mit *in vitro* transkribierten und translatierten, mit [<sup>35</sup>S]-Methionin-markierten Proteinen (s. 3.8.2) in NP40-Lysepuffer

mit Proteaseinhibitoren (PMSF 1 mM, Aprotinin 10 U/ $\mu$ l, Leupeptin 1  $\mu$ g/ $\mu$ l, Pepstatin 1  $\mu$ g/ $\mu$ l und DTT 1% (v/v)) über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert (Reagenzglasrotator 3025, GFL). Die Glutathion-Sepharose und die damit assoziierten Proteine wurden nun durch Zentrifugation (6000 UpM, 5 min; Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) pelletiert und das Pellet viermal in TBS Puffer mit Proteaseinhibitoren gewaschen. Die Proben wurden mit 10  $\mu$ l SDS Probenpuffer versetzt und für 3 min auf 95 °C erhitzt und anschließend auf einem 12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (s. 3.8.5). Die radioaktiv markierten Proteine wurde durch Autoradiographie (s. 3.8.7.2) sichtbar gemacht. An Stelle von *in vitro* translatierten Proteinen wurde auch Gesamtzellysat (s. 3.8.3) verwendet. In diesem Fall wurden die Proteine durch *Western Blot* identifiziert.

**NP40 Puffer:**

50 mM	Tris-HCl, pH 8
150 mM	NaCl
5 mM	EDTA
0,15%	Nonidet P-40 (v/v)

### 3.8.8.2 Immunopräzipitation

Das Prinzip der Immunpräzipitation beruht auf der spezifischen Erkennung eines Zielproteins durch einen an eine Sepharose-Matrix gekoppelten Antikörper, was eine Isolierung von Proteinen bzw. Proteinkomplexen ermöglicht. Die Kopplung von Antikörpern aus Maus und Kaninchen erfolgte an Protein A-Sepharose (Sigma). Protein A bindet spezifisch an den Fc-Teil von Antikörpern, was eine indirekte Kopplung der Antikörper an die Sepharose-Matrix zur Folge hat. Ebenso wurde Agarose verwendet, an die bereits der Flag-M2 Antikörper gekoppelt war (Sigma). Der an die Sepharose-Matrix gebundene Protein-Antikörper-Komplex kann im Anschluss daran aufgrund des hohen Molekulargewichts der Sepharose durch Zentrifugation sedimentiert werden. Gebundene Proteine können daraufhin durch Erhitzen des Präzipitats für 3 min auf 95 °C in einem geeigneten Probenpuffer wieder in Lösung gebracht und anschließend über SDS-Polyacrylamidelektrophorese aufgetrennt werden (s. 3.8.5). Durch Koimmunpräzipitation ist es möglich, spezifische Bindungen von Proteinen an das vom Antikörper erkannte Protein nachzuweisen.

Pro Ansatz wurden 3 mg lyophilisierte Protein A-Sepharose in 10 ml RIPA-Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren (s. 3.8.3) 1 h bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler (Reagenzglasrotator 3025; GFL) äquilibriert. Die Suspension wurde daraufhin bei 4 °C 5 min bei 600 UpM abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf), das Sediment in 1 ml gekühltem Lysepuffer gewaschen und in 1 ml aufgenommen. Zu dieser Suspension wurde die entsprechende Menge Antikörper gegeben, die Bindung der Antikörper an die Matrix fand während einer einstündigen Inkubation bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler statt. Die Suspension wurde daraufhin erneut bei 600 UpM für 5 min, 4 °C abzentrifugiert, die Sepharose in 1 ml gekühltem Lysepuffer gewaschen, erneut abzentrifugiert und in Lysepuffer resuspendiert. Die bereits mit Flag-M2 Antikörper gekoppelten Agarose wurde lediglich dreimal in Lysepuffer gewaschen und konnte danach direkt weiterverwendet werden. Das Gesamtzellysat (s. 3.8.3) wurde zur Eliminierung unspezifischer Bindungen der Proteine mit der Sepharose-Matrix zunächst mit je 50  $\mu$ l

Pansorbin (welches vorher dreimal mit je 1 ml Lysepuffer gewaschen wurde) für 1 h auf einem Überkopfschüttler (Reagenzglasrotator 3025, GFL) bei 4 °C inkubiert und nach Zentrifugation (6000 UpM, 5 min, 4 °C; Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) eingesetzt. Es wurden pro Versuch 0,5-10 mg Gesamtprotein verwendet. Die so vorbereiteten Proteinproben wurden mit der mit Antikörper gekoppelten Sepharose bzw. Agarose versetzt und entweder 2 h oder über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die nach der Immunpräzipitation erhaltene Suspension wurde abzentrifugiert (600 UpM, 5 min, 4 °C; Eppendorf Tischzentrifuge 5417, Eppendorf), dreimal mit je 1 ml gekühltem Lysepuffer gewaschen und das Sediment in 20 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden 3 min bei 95 °C aufgeköcht und anschließend abgekühlt. Die Proben konnten nun durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (s. 3.8.5) aufgetrennt und weiter analysiert werden.

### 3.8.9 Nachweis von Protein-DNA Interaktionen

Mittels Chromatin-Immunoprazipitation kann die Bindung von Proteinen an distinkte DNA-Abschnitte *in vivo* nachgewiesen werden. Hierfür wurden  $5 \cdot 10^6$  Zellen ausgesät, infiziert (s. 3.5.4) und nach 24 h geerntet. Vor dem Abschaben der Zellen wurden diese jedoch zunächst mit PBS gewaschen und DNA-Protein-Komplexe durch Zugabe von Fixierungspuffer für 10 min fixiert. Anschließend wurde für 10 min mit 10% Glyzin in PBS gequenchet. Die Zellen konnten nun von den Kulturschalen abgeschabt und bei 2000 UpM für 3 min zentrifugiert werden (Multifuge 3S-R, Thermo). Die Zellsedimente wurden anschließend in 1 ml Lysepuffer 1 resuspendiert, für 10 min bei 4 °C über Kopf rotiert (Reagenzglasrotator 3025, GFL) und bei 13000 UpM für 5 min abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf). Nach Resuspendieren des Pellets in 1 ml Lysepuffer 2 und erneutem Rotieren wurde wie oben zentrifugiert. Nun wurde das Zellpellet in 1 ml Lysepuffer 3 aufgenommen und zweimal für 7 min mit Ultraschall (40 s, output 0,45-0,6 Impulse/s; Branson Sonifier 450) behandelt. Zu den Lysaten wurde nun 100 µl 10% Triton-X-100 gegeben, der Ansatz gut durchmischt und zentrifugiert (14000 UpM, 10 min; Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf). Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 9 Vol. Puffer A und mit 50 µl an Agarose gekoppelte Herings-Sperma-DNA versetzt und rotierend für 1 h bei 4 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und aliquotiert (je 1 ml). Zu diesem Chromatin-Lysat wurde der gewünschte Antikörper gegeben (2-4 µg, abhängig vom Antikörper) und die Suspension über Nacht bei 4 °C über Kopf rotiert. Für die Chromatin-Immunpräzipitation wurden die Chromatin-Lysate mit je 30 µl Herings-Sperma Agarose versetzt und für 2-4 h rotierend bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (14000 UpM, 10 min; Eppendorf Tischzentrifuge 5417R, Eppendorf) und das Pellet in Waschpuffer 1 aufgenommen, bevor es erneut zentrifugiert wurde. Es folgten Waschschrte in Waschpuffer 2 mit anschließender Zentrifugation und in Waschpuffer 3 mit nachfolgender Zentrifugation sowie in TE-Waschpuffer. Nachdem die Agarose erneut sedimentiert worden ist, wurde das Pellet in 70 µl TE-Puffer resuspendiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden nun bei 99 °C für 10 min aufgeköcht, kurz auf Eis auf Raumtemperatur abgekühlt und mit je 1 µl Proteinase K versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 55 °C und 10-minütiger Inkubation bei 99 °C erfolgte die

PCR Reaktion. Hierfür wurden 1,5 µl der Probe mit 10 µl *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 7,3 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> und 1,2 µl der entsprechenden Primer gemischt und die *Real Time* PCR mit dem Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia) durchgeführt. Das Standard PCR-Programm war folgendes: 10 min bei 95 °C; 50 Zyklen 12 s bei 95 °C, 40 s bei 60 °C und 15 s bei 72 °C. Zur Ermittlung der Werte wurden Kontrollen (anstelle des Antikörpers IgG ) sowie die eingesetzte Chromatinmenge mit einbezogen. Alle Werte über 0,5% des Inputs gelten als Bindung, wobei Werte über 1% eine gute Bindung darstellen.

**10x Fixierpuffer:**

50 mM	Hepes (w/v)
100 mM	NaCl (w/v)
1 mM	EDTA (w/v)
11%	Formaldehyd (v/v)

**Lysepuffer 1:**

50 mM	Hepes/KOH, pH 8,8 (w/v)
140 mM	NaCl (w/v)
1 mM	EDTA (w/v)
10%	Glyzerin (v/v)
0,5%	NP40 (v/v)
0,25%	Trito-X-100 (v/v)

**Lysepuffer 2:**

10 mM	Tris/HCl, pH 8,0 (w/v)
200 mM	NaCl (w/v)
1 mM	EDTA (w/v)
0,5 mM	EGTA (w/v)

**Lysepuffer 3:**

50 mM	Tris/HCl (w/v)
1%	SDS (w/v)
10 mM	EDTA (w/v)

**Puffer A:**

16,7 mM	Tris/HCl (w/v)
167 mM	NaCl (w/v)
1,2 mM	EDTA (w/v)
0,01%	SDS (v/v)
1,1%	Triton-X-100 (v/v)

**Waschpuffer 1:**

20 mM	Tris/HCl (w/v)
150 mM	NaCl (w/v)
2 mM	EDTA (w/v)
0,1%	SDS (v/v)
1%	Triton-X-100 (v/v)

**Waschpuffer 2:**

20 mM	Tris/HCl, pH 8,0 (w/v)
500 mM	NaCl (w/v)
2 mM	EDTA (w/v)
0,1%	SDS (v/v)
1%	Triton-X-100 (v/v)

**Waschpuffer 3:**

10 mM	Tris/HCl (w/v)
0,25 mM	LiCl (w/v)
1 mM	EDTA (w/v)
1%	NP40 (v/v)
1%	Natrium Deoxycholat (w/v)

**TE-Waschpuffer:**

50 mM	Tris/HCl, pH 7,5 (w/v)
10 mM	EDTA, pH 8,0 (w/v)

**TE-Puffer:**

50 mM	Tris/HCl, pH 9,5 (w/v)
10 mM	EDTA, pH 8,0 (w/v)

## 3.9 Immunfluoreszenz-Analysen

### 3.9.1 Fixierung mit Methanol

Subkonfluente, adhärenente Zellen wurden in 6-well Zellkulturschalen auf sterilen Deckgläsern kultiviert und ggf. transfiziert (s. 3.3.4.1) oder infiziert (s. 3.5.4). Zur Fixierung der Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Objektträger mit PBS gewaschen und für 15 min in eiskaltem Methanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen bei RT getrocknet und konnten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert oder sofort für den immunologischen Nachweis eingesetzt werden.

### 3.9.2 Immunologischer Nachweis

Für den immunologischen Nachweis wurden die Deckgläser auf Parafilm (Pechiney Plastic Packaging) überführt und zur Absättigung unspezifischer Bindestellen zunächst für 1 h mit TBS-BG (s. 3.5.3) inkubiert. Nach Entfernen des Überstandes und drei Waschschritten mit PBS wurden pro Deckglas  $20\ \mu\text{l}$  Primärantikörper in geeigneter Verdünnung in PBS zugegeben und 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte auf die gleiche Weise die Inkubation mit einem sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper, der als 1:100 Verdünnung in PBS verwendet wurde. Zur Anfärbung der DNA-Chromatinkomplexe wurden  $0,5\ \mu\text{g/ml}$  DAPI (4',6 Diamidin-2'-phenylindol Dihydrochlorid; Sigma) zugesetzt. Nicht gebundener Sekundärantikörper wurde durch die folgenden drei Waschschrritte mit PBS entfernt. Die Deckgläser wurden mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf einen Objektträger gelegt und mit Glow Mounting Medium (EnerGene) eingebettet. Die Versuchsansätze konnten abgedunkelt bei  $4^{\circ}\text{C}$  mehrere Tage bis wenige Wochen gelagert werden. Die weitere Analyse erfolgte mit Hilfe eines DM6000 Immunfluoreszenzmikroskops (Leica) mit digitalem Bildverarbeitungssystem (Leica Application Suite).

## 3.10 Lumineszenz-basierte Reporterversuche

Zur quantitativen Bestimmung von Promotoraktivitäten wurde das Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega) nach Anweisungen des Herstellers verwendet. Die Reporterplasmide enthalten das Firefly-Luziferase-Gen aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* unter der Kontrolle des jeweiligen Promotors. Es wurden die adenoviralen Promotoren E1A (pGL3-Basic Prom E1A), E1B (pGL3-Basic Prom E1B), pIX (pGL3-Basic Prom pIX), E2<sub>early</sub> (pGL3-Basic Prom E2e), E2<sub>late</sub> (pGL3-Basic Prom E2l), E3 (pGL3-Basic Prom E3), E4 (pGL3-Basic Prom E4) und der *Major late* Promotor (pGL3-Basic Prom MLP) sowie der zelluläre HoXB7 Promotor (pGL3-Basic Prom HoxB7) verwendet. Die Reporterkonstrukte wurden zusammen mit verschiedenen Expressionskonstrukten (pcDNA-E1A, pcDNA-E4orf6, pcDNA-E4orf6/7) in H1299 Zellen, pSuper oder shHox Zellen transfiziert. Als interne Kontrolle wurde zusätzlich der Vektor pRL-TK transfiziert, der das Renilla-Luziferase-Gen aus *Renilla reniformis* unter

Kontrolle des konstitutiven Thymidin-Kinase-Promotors enthält. Beide Luziferasen sind jeweils unter unterschiedlichen Bedingungen aktiv und können somit unabhängig voneinander angeregt und vermessen werden. Die Messung der Renilla-Luziferase (pRL-TK) wurde dazu benutzt, die verschiedenen Lysate zu normieren und der Wert der Promotoraktivität wurde als Quotient aus Firefly-Luziferase-Aktivität zu Renilla-Luziferase-Aktivität berechnet. Für die Versuche wurden  $1 \cdot 10^5$  Zellen in 12-well Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag mit  $0,3 \mu\text{g}$  pRL-TK,  $0,5 \mu\text{g}$  Reporterplasmid und  $0,5 \mu\text{g}$  Expressionsplasmid mit der PEI-Methode (s. 3.3.4.1) transfiziert. Nach 48 h Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen,  $100 \mu\text{l}$  *passive lysis buffer* (Promega) pro Ansatz auf die Zellen gegeben und 15 min bei RT geschüttelt. Durch Pipettieren wurden die Zellen daraufhin vollständig abgelöst. Alle weiteren Arbeitsschritte zur Ermittlung der Promotoraktivität wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt und die Promotoraktivitäten mit einem Luminometer (Lumat LB 9507, Berthold) bestimmt.

---

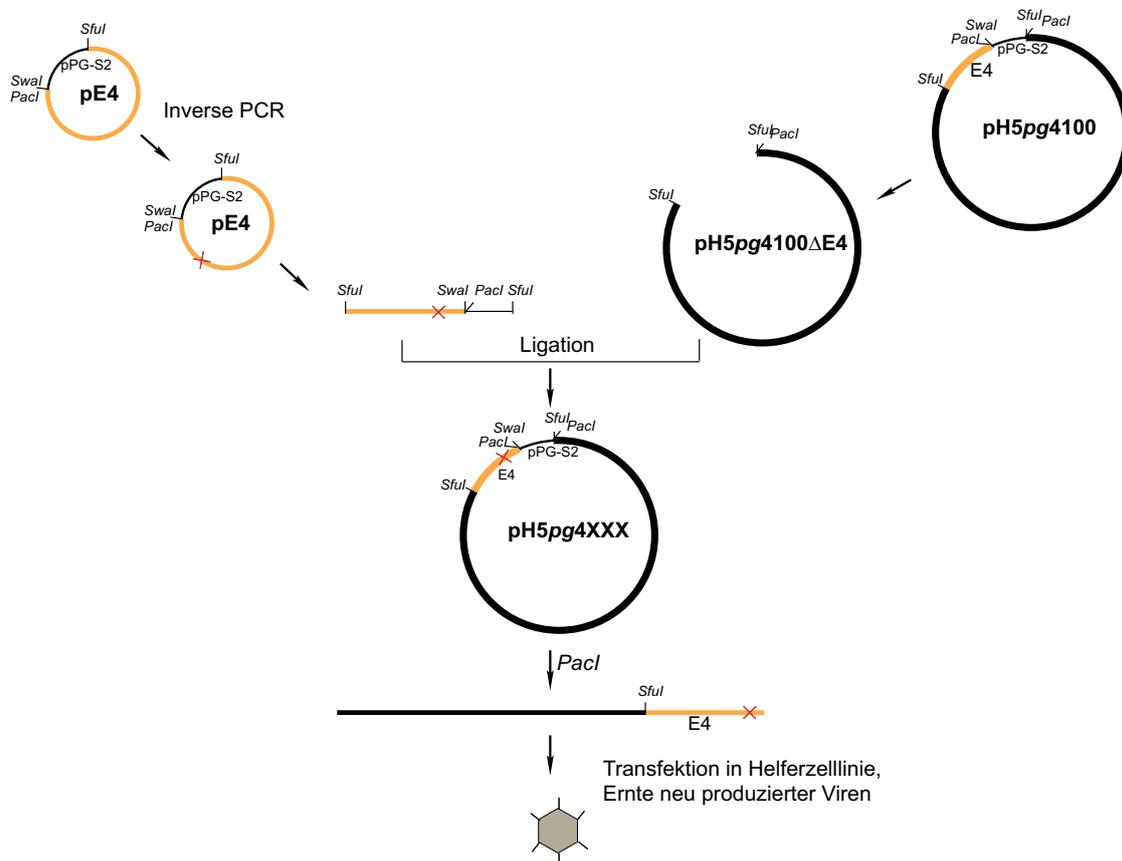
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchung zur Funktion des C-Terminus von E4orf6 im Kontext der viralen Replikation

Das adenovirale frühe Protein E4orf6 konnte in Transformationsexperimenten mit Nagetierzellen neben E1A und E1B als weiteres virales Onkogen identifiziert werden. Dieses Genprodukt verleiht E1-transformierten Zellen zusätzliche Wachstumeigenschaften, die zu einer erhöhten Onkogenität in Versuchstieren sowie zu einer veränderten Morphologie der transformierten Zellen führt (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1999a). Die Steigerung der Onkogenität wurde zunächst mit der Fähigkeit von E4orf6, die subzelluläre Lokalisation (Moore *et al.*, 1996) bzw. die Stabilität von p53 zu beeinflussen (Nevels *et al.*, 1999a), begründet. Der von den viralen Proteinen E1B-55K und E4orf6 mit einigen zellulären Komponenten assemblierte E3-Ubiquitin-Ligase Komplex ist verantwortlich für den proteasomalen Abbau von p53 (Querido *et al.*, 2001a,b). Die Erhöhung der Onkogenität als Folge der durch E1B-55K und E4orf6 induzierten Reduktion der p53 Expression, ruft vermutlich eine erhöhte Zellproliferation hervor und ist nicht auf reduzierte Apoptose zurückzuführen (Nevels *et al.*, 1999a). In detaillierteren Untersuchungen wurde der C-Terminus von E4orf6 zunächst für die Repression der p53-Aktivität (Nevels *et al.*, 1997), später auch für die morphologische Hypertransformation und *Focus*-Bildung als essentiell und ausreichend identifiziert. Entgegen vorherigen Vermutungen zeigte sich dabei jedoch, dass diese E4orf6-vermittelten Eigenschaften nicht von der p53-Stabilität abhängig sind. Die Onkogenität von E4orf6 ist dagegen teilweise von dem Abbau von p53 abhängig, wie anhand des Tumorwachstums nach Injektion der transformierten Zellen in Nacktmäuse ermittelt wurde. Der C-Terminus des Proteins alleine zeigt gegenüber dem Wildtyp ein reduziertes Potential, das Tumorwachstum zu fördern (Nevels *et al.*, 2000). Nachdem die amphipatische  $\alpha$ -Helix im C-Terminus des E4orf6 Proteins als essentiell für die produktive Adenovirusinfektion (Orlando und Ornelles, 1999) sowie dessen onkogene Eigenschaften identifiziert wurde, ist anzunehmen, dass die lytischen und transformierenden Funktionen eng miteinander verknüpft sind (Nevels *et al.*, 2000). Im ersten Teil dieser Arbeit sollte daher der Einfluss des C-Terminus des E4orf6 Proteins, der Onkodomäne, auf den viralen Infektionszyklus getestet werden. Es sollte untersucht werden, ob dieser Bereich des frühen viralen Proteins eine produktive Infektion unterstützt.

### 4.1.1 Herstellung der Virusmutanten H5pm4182 und H5pm4229

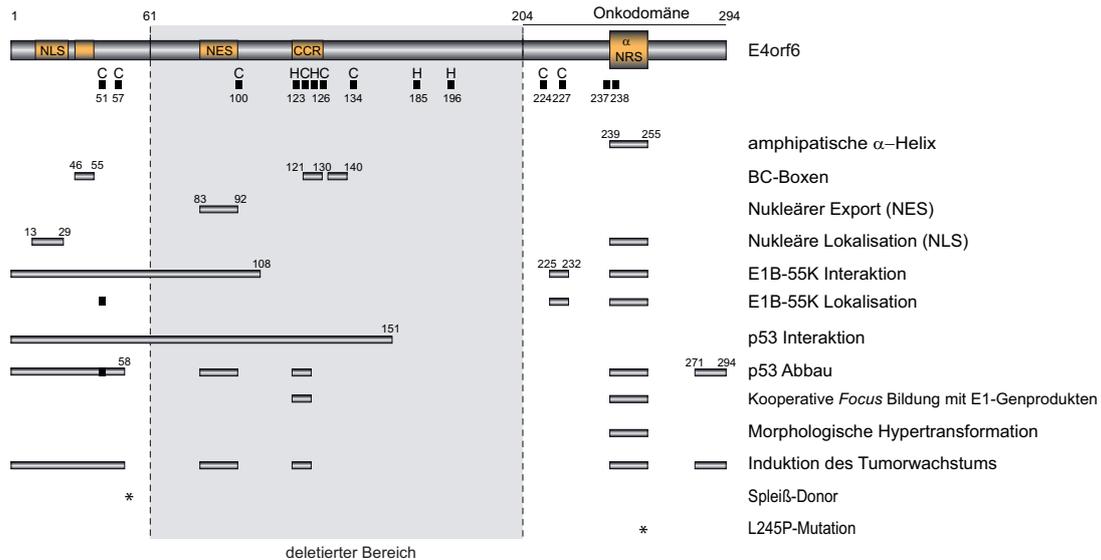
Um den Einfluss der Onkodomäne auf die virale Replikation zu untersuchen, wurden Virusmutanten mit dem C-Terminus des E4orf6 Proteins generiert. Die Herstellung der Virusmutanten erfolgte nach einem in der Arbeitsgruppe etabliertem direkten Klonierungssystem (Groitl und Dobner, 2007). Hierbei wurde zunächst, ausgehend von der E4-Box (Nr. 1155; s. 2.3.3), eine Inverse-PCR zur Deletion spezifischer Aminosäuren im E4orf6 Protein durchgeführt (s. 3.6.7.3) bzw. eine Punktmutation durch *in vitro* Mutagenese (s. 3.6.7.2) eingeführt. Diese modifizierten E4-Boxen wurden anschließend wieder in das 36 kb große HAdV5-Restgenom integriert. Die generierten Bakmide wurden nach Linearisierung der DNA in 2E2 Helferzellen, welche die AdV5 E1- sowie E4-Region stabil exprimieren, transfiziert (s. 3.5.1). Anschließend konnten die Virusmutanten H5pm4182 und H5pm4229 geerntet und propagiert werden (s. 3.5.2). Ein Schema zur Herstellung dieser beiden Virusmutanten ist in Abb. 4.1 zu sehen.



**Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Herstellung von Virusmutanten.** Eine genauere Erklärung ist dem Text zu entnehmen.

Die hergestellten Virusmutanten sollten nur die letzten C-terminalen 91 Aminosäuren des E4orf6 Proteins enthalten. Da im N-Terminus des E4orf6 Proteins, nach Position 58, die Spleißdonorstelle zum Herstellen des E4orf6/7 Proteins lokalisiert ist, und außer dem E4orf6 Protein kein weiteres virales Protein durch die Mutation beeinträchtigt werden soll, wurden die ersten 61 Aminosäuren beibehalten. Die schematische Darstellung dieses neuen Fu-

sionsproteins der Virusmutante H5pm4182 sowie darin möglicherweise enthaltene funktionelle Bereiche sind in Abb. 4.2 zu sehen. Weiterhin wurde eine Virusmutante hergestellt, die zusätzlich eine Punktmutation in der Onkodomäne an Aminosäureposition 245 trägt (Onko-L245P; H5pm4229). Die Einführung der Aminosäure Prolin wirkt als so genannter Helixbrecher und verändert die Sekundärstruktur der  $\alpha$ -Helix. Damit sind, wie mit mutierten E4orf6 Plasmiden gezeigt werden konnte, wichtige Funktionen des E4orf6 Proteins beeinflusst (Orlando und Ornelles, 1999). Die E4orf6 Proteine der neuen Virusmutanten enthalten demnach, wie die Abb. 4.2 zeigt, nur noch eine BC-Box und kein NES, während beide NLS Sequenzen vorhanden sind.



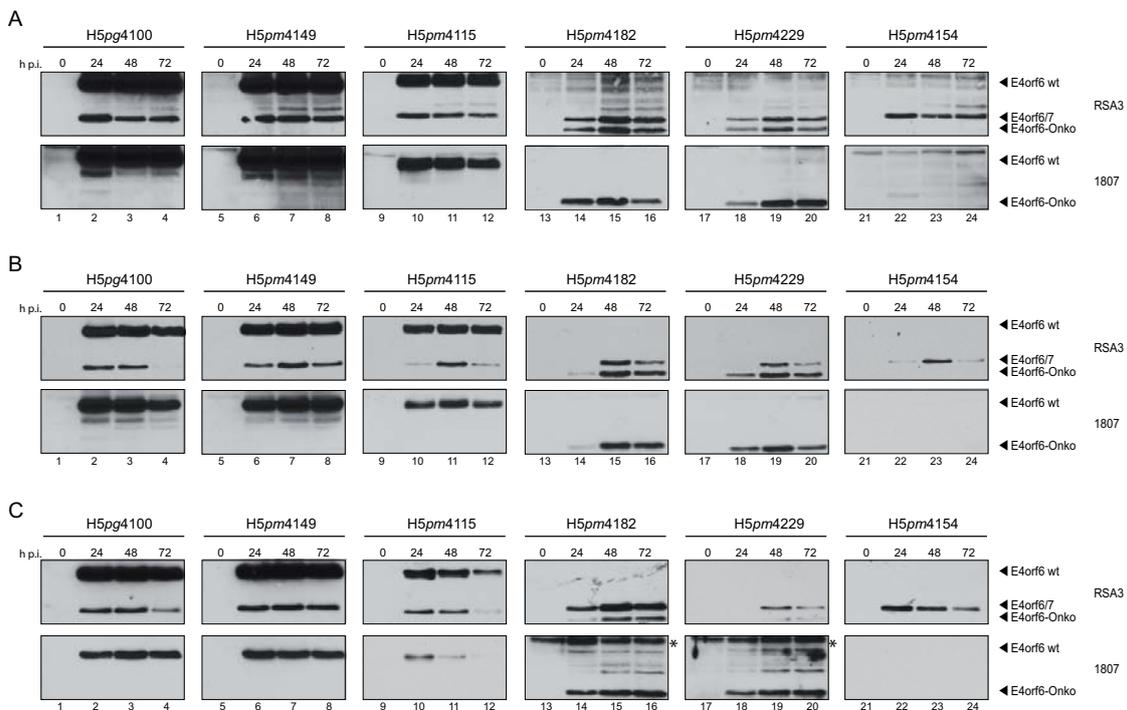
**Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der E4orf6 Proteine der Viren H5pm4182 und H5pm4229.** Wichtige funktionelle Bereiche im E4orf6 Protein sind dargestellt (nach Nevels *et al.*, 2000; Täuber und Dobner, 2001). Der in den Virusmutanten deletierte Bereich ist grau unterlegt. Eine genauere Erklärung ist dem Text zu entnehmen.

#### 4.1.2 Charakterisierung der Virusmutanten H5pm4182 und H5pm4229

Die neu generierten Virusmutanten sollten nun in verschiedenen Zelllinien untersucht werden. Hierfür wurden die Tumorzelllinien H1299 und A549 sowie die pseudoprimären retinalen Gliazellen Mio-M1, wie unter 3.5.4 beschrieben, infiziert. Da die Effizienz der Infektion von Adenoviren in Tumorzellen gesteigert ist (Miller *et al.*, 2007), wurde dies bei Mio-M1 Zellen durch Infektion mit einer größeren Virusmenge kompensiert. Es sollte die Expression von frühen und späten viralen Proteinen im Verlauf des viralen Lebenszyklus sowie deren subzelluläre Lokalisation analysiert werden. Des Weiteren sollten die Virusmutanten hinsichtlich der Produktion von Nachkommenviren untersucht werden.

## 4.1.2.1 Expression viraler Proteine

Um die eingeführten Mutationen im E4orf6 Protein der neu generierten Virusmutanten H5pm4182 und H5pm4229 zu untersuchen, wurde zunächst dessen Expression auf Proteinebene analysiert. Hierfür wurden die Zellen mit dem Wildtyp und den verschiedenen Virusmutanten infiziert (s. 3.5.4), nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet (s. 3.3.5) und Gesamtzellextrakte hergestellt (s. 3.8.3). Mittels SDS-Gelelektrophorese (s. 3.8.5) konnten die viralen Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt und über *Western Blot* (s. 3.8.6) analysiert werden. Wie in Abb. 4.3 ersichtlich, sind in den beiden neuen Virusmutanten die E4orf6-Onko Proteine der erwarteten Größe von etwa 17 kDa sowohl mit dem Antikörper RSA3, der den N-Terminus erkennt, als auch mit dem Antikörper 1807, dessen Epitop im C-Terminus gelegen ist, in allen untersuchten Zelllinien detektierbar.



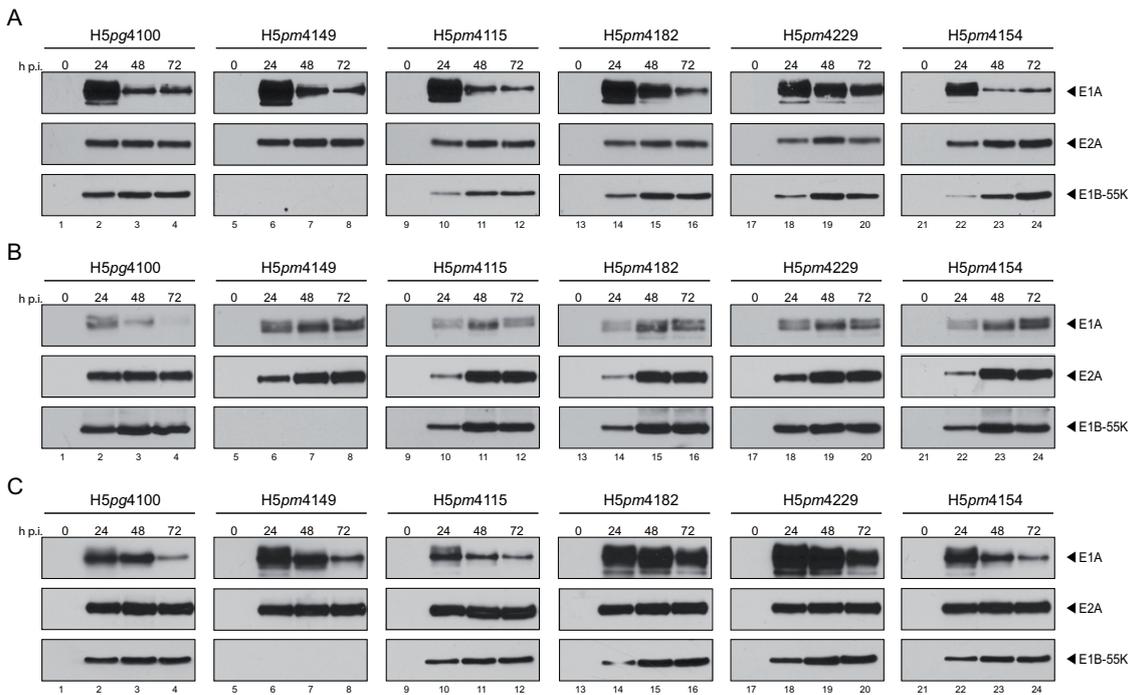
**Abbildung 4.3: Analyse zur Produktion von E4orf6 Proteinen in infizierten Zellen.** Es wurden A549 (A), H1299 (B) und Mio-M1 (C) Zellen mit H5pg4100 sowie den Virusmutanten H5pm4149, H5pm4115, H5pm4182, H5pm4229 und H5pm4154 infiziert (A549 und H1299: moi 25, Mio-M1: moi 200), zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und Gesamtzellextrakt hergestellt (0 bedeutet nicht-infiziert). Zur Überprüfung der Proteinexpression wurden diese (40  $\mu$ g) auf 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Antikörpern gegen E4orf6 und den jeweiligen HRPO-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert. Die mit \* markierten Blots wurden für die maximale Zeit exponiert.

Im Vergleich zum Wildtypvirus H5pg4100 oder den Virusmutanten H5pm4149 und H5pm4115 ist die Expression der verkürzten E4orf6 Proteine bei den Viren H5pm4182 und H5pm4229 jedoch deutlich reduziert. Verglichen mit A549 (Abb. 4.3 A) und H1299 (Abb. 4.3 B) Zellen ist dies in den Mio-M1 Zellen (Abb. 4.3 C) besonders auffällig. Während das Volllänge E4orf6 Pro-

tein nach 24 h stark exprimiert ist (Abb. 4.3; Spuren 2, 6, 10), nach 48 h und 72 h (Abb. 4.3; Spuren 3, 4, 7, 8, 11, 12), wie in der Literatur beschrieben, leicht abnimmt (Boivin *et al.*, 1999), ist für die verkürzten E4orf6 Proteine eine Zunahme der Expression bei 48 h (Abb. 4.3; Spuren 15, 19) und teilweise bei 72 h (Abb. 4.3; Spuren 16, 20) zu erkennen. Anzumerken ist, dass in Mio-M1 Zellen mit dem 1807 Antikörper die verkürzten E4orf6 Proteine mit derselben Expositionszeit wie die anderen Proteine nicht nachgewiesen werden konnten; in der Abb. 4.3 C ist daher hier eine maximale Exposition dargestellt. Wie erwartet, kann mit dem RSA3 Antikörper in allen Zelllinien auch das E4orf6/7 Protein detektiert werden. Dieses Protein hat ein den E4orf6-Onko-Proteinen ähnliches Molekulargewicht und zeigt ein ähnliches Expressionsmuster.

Das verkürzte E4orf6 Protein ist in mit dem H5pm4229 Virus infizierten A549 und Mio-M1 Zellen mit dem RSA3 Antikörper deutlich schlechter nachzuweisen als mit dem 1807 Antikörper (Abb. 4.3 A, C; Spuren 18-20). Obwohl das Epitop dieses Antikörpers im N-Terminus des Proteins gelegen ist, kann eine Konformationsänderung des Proteins durch Zerstörung der Integrität der  $\alpha$ -Helix nicht ausgeschlossen werden.

Um einen Einfluss der Mutation im E4orf6 Protein auf andere virale Proteine auszuschließen, wurden nun ebenfalls die Expressionsspiegel der frühen viralen Proteine E1A, E2A und E1B-55K untersucht. Wie der Abbildung 4.4 zu entnehmen ist, sind in den verschiedenen Zelllinien für E2A und E1B-55K keine signifikanten Unterschiede im H5pm4182 und H5pm4229 gegenüber dem Wildtypvirus H5pg4100 bzw. den weiteren Virusmutanten auszumachen. Dabei ist in Zellen, die mit dem E1B-55K-negativen Virus H5pm4149 infiziert wurden, dieses virale Protein erwartungsgemäß nicht nachweisbar. In allen weiteren, hier untersuchten, Virusmutanten und dem Wildtypvirus akkumuliert dieses Protein im zeitlichen Verlauf der Infektion. Das Protein E2A ist bereits 24 h nach der Infektion stark exprimiert und zeigt diese Expression auch beim Fortschreiten der Virusinfektion. Lediglich die Expression von E1A unterscheidet sich in den verschiedenen untersuchten Viren. So ist in Mio-M1 Zellen die Expression dieses Proteins bei den beiden Virusmutanten H5pm4182 und H5pm4229, verglichen mit den anderen Viren, bei allen untersuchten Zeitpunkten erhöht (Abb. 4.4 C; Spuren 14-16, 18-20). Weiterhin sind auch in H1299 Zellen die Mengen dieses Proteins in den Virusmutanten H5pm4149, H5pm4115, H5pm4182, H5pm4229 und H5pm4154 48 h (Abb. 4.4 B; Spuren 7, 11, 15, 19, 23) und 72 h (Abb. 4.4 B; Spuren 8, 12, 16, 20, 24) nach der Infektion größer als zum gleichen Zeitpunkt während der Wildtypvirusinfektion (Abb. 4.4 B; Spuren 3 bzw. 4).

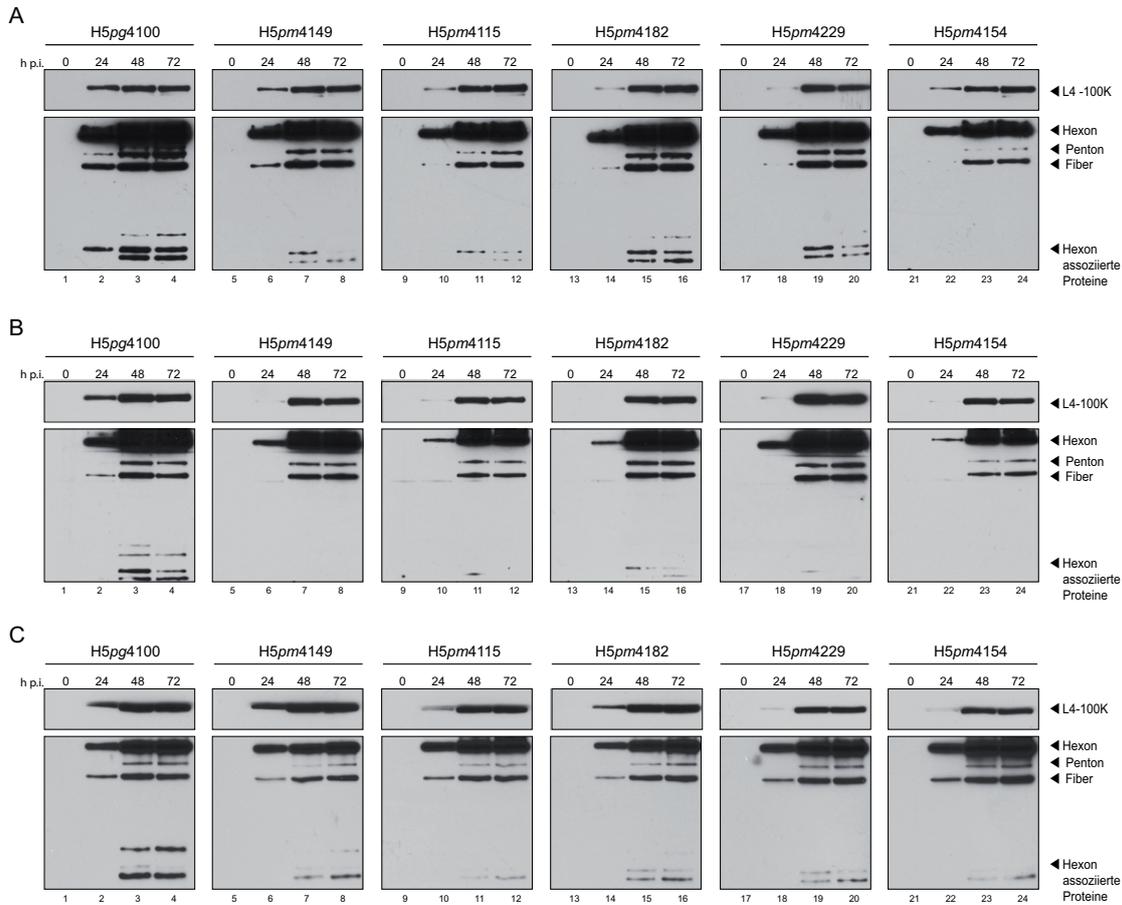


**Abbildung 4.4: Analyse zur Produktion früher viraler Proteine in infizierten Zellen.**

Es wurden A549 (A), H1299 (B) und Mio-M1 (C) Zellen mit H5pg4100 sowie den Virusmutanten H5pm4149, H5pm4115, H5pm4182, H5pm4229 und H5pm4154 infiziert (A549 und H1299: moi 25, Mio-M1: moi 200), zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und Gesamtzellextrakt hergestellt (0 bedeutet nicht-infiziert). Zur Überprüfung der Proteinexpression wurden diese (40 µg E1A, 5 µg E2A, 40 µg E1B-55K) auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert, mit Antikörpern gegen E1A (M73), E2A (B6-8) und E1B-55K (2A6) und den jeweiligen HRPO-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert.

Neben der Analyse einiger früher viraler Proteine erfolgte auch die Analyse der späten viralen Strukturproteine sowie des späten regulatorischen Proteins L4-100K. Es ist bekannt, dass Virusmutanten, denen ein funktionelles E4orf6 oder E1B-55K fehlt, schwere Defekte bei der Synthese später Strukturproteine und damit auch der Produktion an Nachkommenviren aufweisen, da ihre Funktionen u. a. beim Export viraler mRNAs nicht mehr erfüllt werden (Halbert *et al.*, 1985; Hemström *et al.*, 1988; Babich *et al.*, 1983; Pilder *et al.*, 1986). Des Weiteren hat das Fehlen von E1B-55K einen negativen Einfluss auf die Produktion später Proteine, da dieses frühe Genprodukt vermutlich durch Interaktion mit L4-100K die selektive Translation von viralen Transkripten regulieren kann (Koyuncu, 2009). Konsistent mit diesen Beobachtungen zeigen in dem hier durchgeführten Versuch die Virusmutanten H5pm4149, H5pm4154 und H5pm4115 eine deutlich reduzierte Expression später viraler Proteine in allen untersuchten Zelllinien (Abb. 4.5). Die Virusmutanten H5pm4182 und H5pm4229 weisen gegenüber dem Wildtyp ebenfalls eine deutlich reduzierte Expression dieser Proteine auf, jedoch zeigen diese beiden Virusmutanten in H1299 Zellen (Abb. 4.5 B) einen ebenso starken Defekt wie das E1B-55K-negative oder das E4orf6-negative Virus, während dies in A549 (Abb. 4.5 A) und Mio-M1 Zellen (Abb. 4.5 C) nicht der Fall ist. In diesen beiden Zelllinien ist die Expression der späten viralen Proteine stärker als bei den drei anderen Virusmutanten.

Das L4-100K Protein zeigt in seinem Expressionsmuster eine weitgehende Übereinstimmung bei den untersuchten Virusmutanten und dem Wildtypvirus.

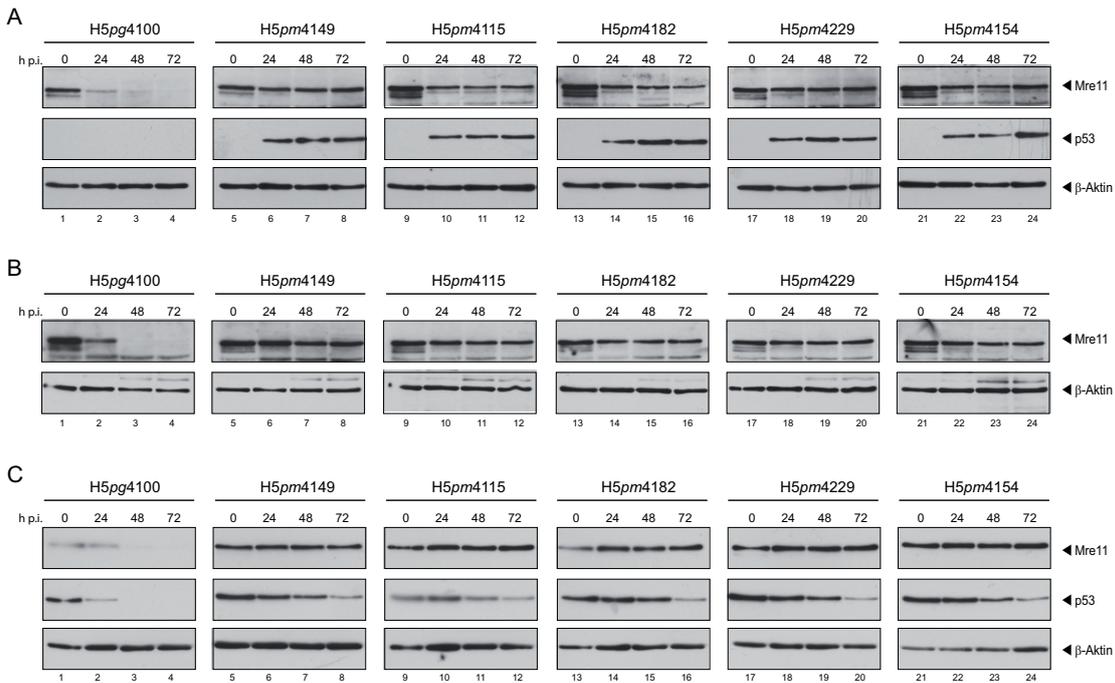


**Abbildung 4.5: Analyse zur Produktion später viraler Proteine in infizierten Zellen.**

Es wurden A549 (A), H1299 (B) und Mio-M1 (C) Zellen mit H5pg4100 sowie den Virusmutanten H5pm4149, H5pm4115, H5pm4182, H5pm4229 und H5pm4154 infiziert (A549 und H1299: moi 25, Mio-M1: moi 200), zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und Gesamtzellextrakt hergestellt (0 bedeutet nicht-infiziert). Zur Überprüfung der Proteinexpression wurden diese ( $3\mu\text{g late}$ ,  $20\mu\text{g L4-100K}$ ) auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Antikörpern gegen das L4-100K Protein (6B10) sowie dem Kapsid-Antikörper gegen mehrere späte Strukturproteine mit den jeweiligen HRPO-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert.

#### 4.1.2.2 Abbau von p53 und Mre11

Um zu testen, ob die Mutationen im E4orf6 Protein, dessen Fähigkeit, in Assoziation mit E1B-55K zelluläre Substrate dem proteasomalen Abbau zuzuführen (vgl. 1.1.5), beeinflusst, wurden die Expressionsspiegel der Proteine p53 und Mre11 untersucht. Wie erwartet, zeigt sich sowohl für Mre11 als auch für p53 in Wildtyp-infizierten Zellen eine deutliche Reduktion der Expression dieser beiden Proteine (Abb. 4.6). Die Menge an Mre11 ist bereits 24 h nach der Infektion stark reduziert und nimmt im zeitlichen Verlauf weiter ab, so dass 48 h und 72 h nach der Infektion dieses Protein nicht mehr nachgewiesen werden kann.



**Abbildung 4.6: Gleichgewichtsmengen von Mre11 und p53 in infizierten Zellen.** Es wurden A549 (A), H1299 (B) und Mio-M1 (C) Zellen mit H5pg4100 sowie den Virusmutanten H5pm4149, H5pm4115, H5pm4182, H5pm4229 und H5pm4154 infiziert (A549 und H1299: moi 25, Mio-M1: moi 200), zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und Gesamtzellextrakt hergestellt (0 bedeutet nicht-infiziert). Zur Überprüfung der Proteinexpression wurden diese (40 µg Mre11, 40 µg p53 und 20 µg β-Aktin) auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Antikörpern gegen Mre11, p53 und β-Aktin mit den jeweiligen HRPO-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert.

Bei den untersuchten Virusmutanten kann dagegen in keiner Zelllinie eine Reduktion der Mre11 Proteinmenge nachgewiesen werden. In A549 Zellen kann p53, wegen geringer Gleichgewichtsmengen dieses Proteins, in nicht infizierten Zellen bei dieser Expositionszeit nicht detektiert werden (Abb. 4.6 A; Spur 1), im Verlauf der Infektion erfolgt jedoch bei allen Virusmutanten eine Akkumulation des zellulären Proteins (Abb. 4.6 A; Spuren 6-8, 10-12, 14-16, 18-20, 22-24). Dagegen kann im Wildtypvirus zu keinem Zeitpunkt p53 detektiert werden (Abb. 4.6 A; Spuren 2-4). In Mio-M1 Zellen ist die p53 Expression in nicht infizierten Zellen, im Gegensatz zu A549 Zellen, nachweisbar (Abb. 4.6 C; Spur 1), eine Akkumulation in den Virusmutanten erfolgt hier jedoch nicht. Vielmehr ist bei den 48 h und 72 h Zeitpunkten eine Reduktion der p53 Expressionsspiegel zu beobachten (Abb. 4.6 C; Spuren 7, 8, 11, 12, 15, 16, 19, 20, 23, 24). Bei dieser Reduktion handelt es sich vermutlich um *host shut-off*. In den Wildtypvirus-infizierten Zellen ist im Gegensatz dazu eine Reduktion der p53 Proteinmenge bereits nach 24 h zu beobachten, 48 h und 72 h liegt sie unter der Nachweisbarkeitsgrenze (Abb. 4.6 C; Spuren 2-4).

Bei Viren, denen entweder das E1B-55K oder E4orf6 Protein fehlt (H5pm4149, H5pm4154), erfolgt demnach, wie erwartet, kein proteasomaler Abbau der beiden zellulären Proteine, da diese Polypeptide nicht zum Ligase Komplex gebracht werden können bzw. eine Assemblierung

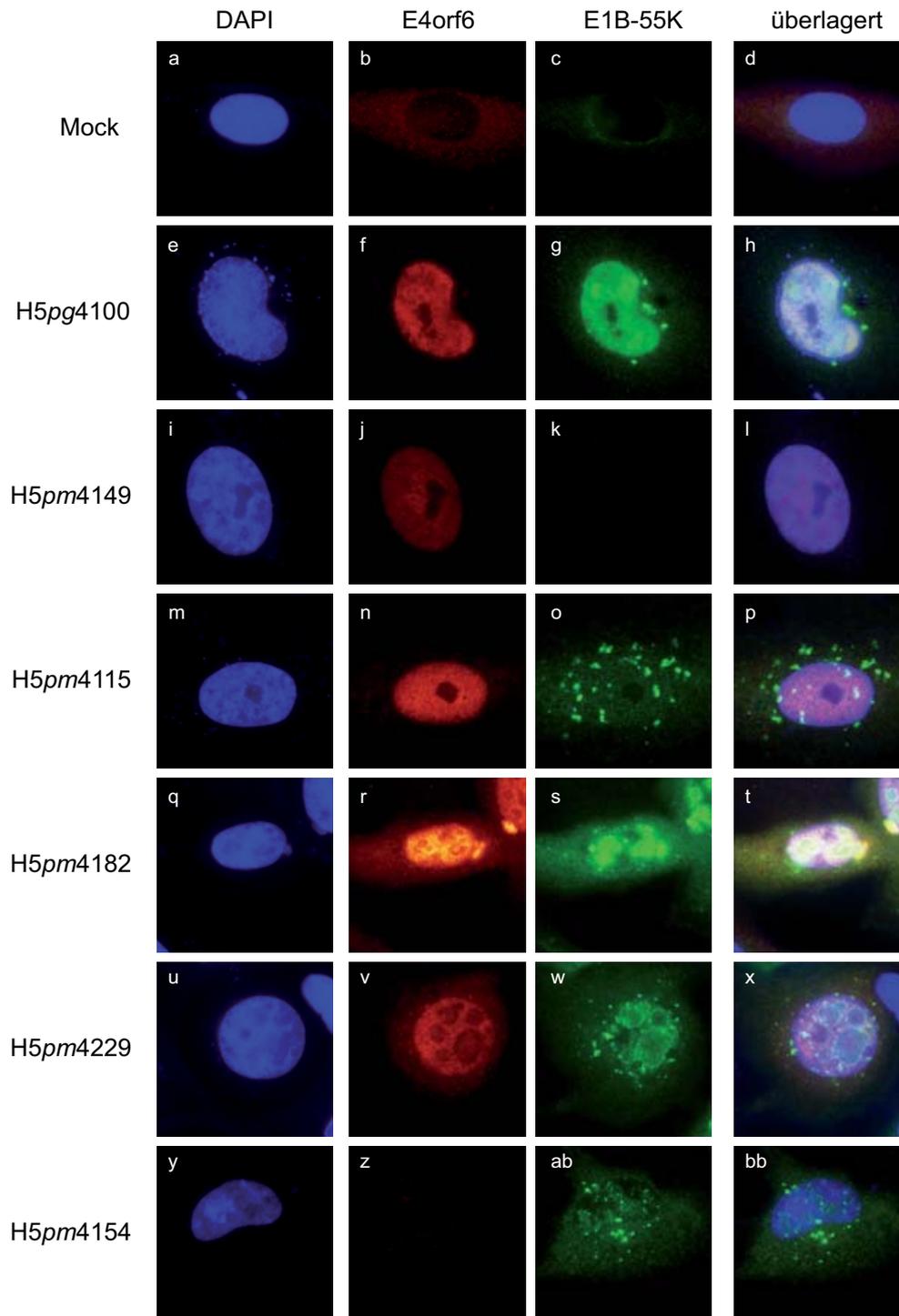
des Komplexes nicht erfolgt. Auch das E4orf6-L245P Virus (H5pm4115) ist, wie die Daten zeigen, nicht in der Lage, einen funktionsfähigen E3-Ubiquitin-Ligase Komplex auszubilden und Mre11 und p53 dem Abbau zuzuführen. Bereits in Versuchen, in denen dieses veränderte Protein ausgehend von Plasmiden exprimiert wurde, konnte dies beobachtet werden (Nevels *et al.*, 2000; Orlando und Ornelles, 1999). Auch in den neu generierten Virusmutanten sind die Expressionsmengen von Mre11 und p53 nicht reduziert, die verkürzten E4orf6 Proteine hinsichtlich der Formation des E3-Ubiquitin-Ligase Komplexes also nicht funktionell. Es ist bekannt, dass für die Interaktion von E4orf6 mit den zellulären Komponenten Elongin B und C beide BC-Boxen im E4orf6 vorhanden sein müssen (Blanchette *et al.*, 2004). Da die Proteine in den Virusmutanten jedoch nur die erste BC-Box besitzen (Abb. 4.2), kann hier der Komplex nicht assembliert und p53 und Mre11 folglich nicht abgebaut werden. Darüber hinaus kann auch die schwächere Expression der verkürzten E4orf6 Proteine einen erfolgreichen proteasomalen Abbau beeinflussen.

#### 4.1.2.3 Subzelluläre Lokalisation viraler und zellulärer Proteine

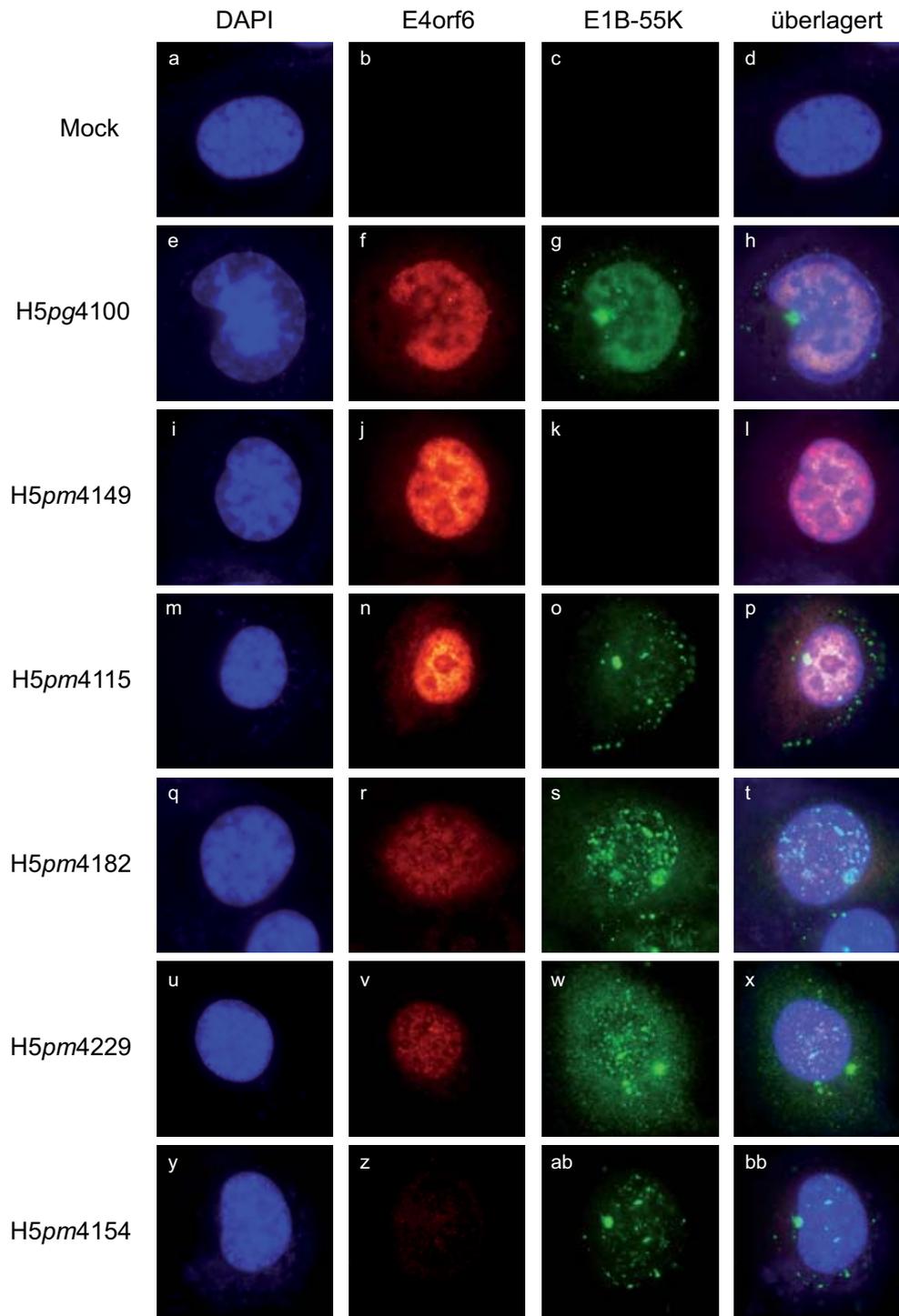
Neben der Expressionspiegel viraler und zellulärer Proteine wurde ebenfalls deren subzelluläre Lokalisation bestimmt, um einen Einfluss der Mutationen zu untersuchen. Hierfür wurden die Zellen infiziert und nach der Fixierung (s. 3.9.1) mit spezifischen Antikörpern gefärbt (s. 3.9.2). Die Proben wurden anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

Es ist bekannt, dass das E4orf6 Protein sowohl ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) als auch ein nukleäres Exportsignal (NES) besitzt. Die subzelluläre Lokalisation dieses Proteins ist aber im Zellkern, wo es mit Aussparung der Nukleoli diffus verteilt vorliegt (Ornelles und Shenk, 1991; Goodrum *et al.*, 1996). Das bekannte NLS des E4orf6 Proteins ist im C-Terminus gelegen (Orlando und Ornelles, 1999), in den Virusmutanten also enthalten. Auch ein weiteres putatives NLS im N-Terminus (Nevels *et al.*, 2000) ist in dem neuen Fusionsprotein enthalten. Bisherige Studien mittels Expressionskonstrukten ohne viralen Hintergrund zeigten, dass das NLS im C-Terminus für die Lokalisierung des Proteins in den Kern ausreichend zu sein scheint (Nevels *et al.*, 2000). Das NES des E4orf6 Proteins liegt zwischen Aminosäuren 83 und 93, und ist daher in den Virusmutanten nicht enthalten, da dies den deletierten Bereich umfasst. Jedoch konnte bereits in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass das E4orf6 Protein, abhängig vom NLS im C-Terminus, trotz funktionellem NES im Kern lokalisiert. Lediglich in Anwesenheit von E1B-55K oder durch Mutation des NLS gelangt E4orf6 ins Zytoplasma (Dobbelstein *et al.*, 1997).

Konsistent mit diesen Daten ist die Lokalisation des verkürzten E4orf6 Proteins in den Virusmutanten H5pm4182 und H5pm4229 wie auch die des E4orf6 Proteins der anderen Viren diffus im Zellkern (Abb. 4.7; Bilder f, j, n, r, v; Abb. 4.8; Bilder f, j, n, r, v).



**Abbildung 4.7: Fluoreszenzmikroskopische Analyse infizierter A549 Zellen.** Es wurde die subzelluläre Lokalisation von E4orf6 und E1B-55K untersucht. Die Zellen wurden mit H5pg4100 sowie den Virusmutanten H5pm4149, H5pm4115, H5pm4182, H5pm4229 und H5pm4154 infiziert (moi 25), nach 24 h mit Methanol fixiert und mit Antikörpern gegen E4orf6 (1807) und E1B-55K (2A6) sowie den entsprechenden Sekundärantikörpern detektiert. Die Zellkerne sind mit DAPI sichtbar gemacht worden.



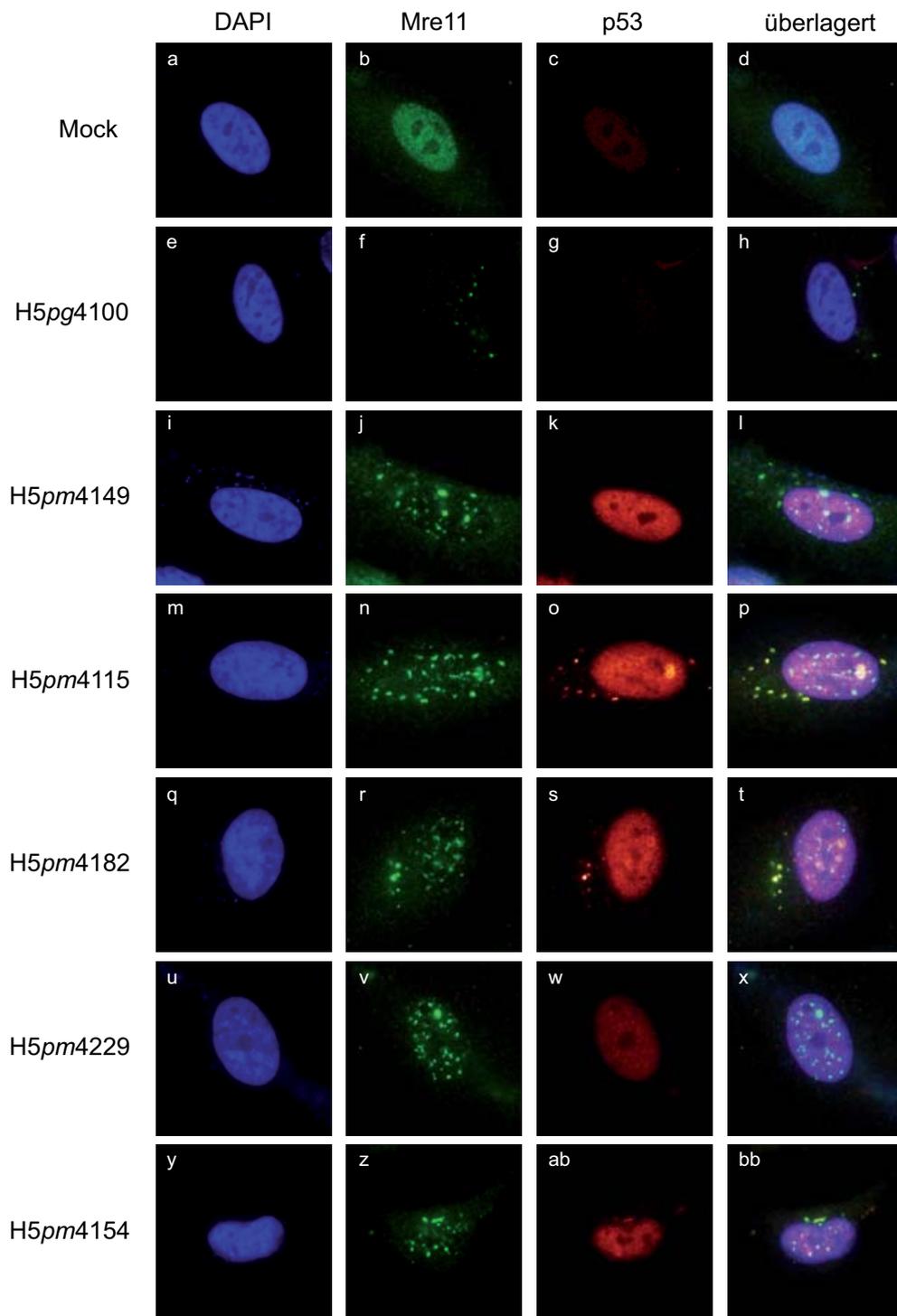
**Abbildung 4.8: Fluoreszenzmikroskopische Analyse infizierter H1299 Zellen.** Es wurde die subzelluläre Lokalisation von E4orf6 und E1B-55K untersucht. Die Zellen wurden mit H5pg4100 sowie den Virusmutanten H5pm4149, H5pm4115, H5pm4182, H5pm4229 und H5pm4154 infiziert (moi 25), nach 24 h mit Methanol fixiert und mit Antikörpern gegen E4orf6 (1807) und E1B-55K (2A6) sowie den entsprechenden Sekundärantikörpern detektiert. Die Zellkerne sind mit DAPI sichtbar gemacht worden.

Allerdings ist die Expression der verkürzten E4orf6 Proteine, wie bereits im *Western Blot* beobachtet werden konnte, schwächer als in den übrigen Virusmutanten oder dem Wildtypvirus. Um hier die Lokalisation deutlich zu machen, wurden, falls möglich, Zellen aufgenommen, die eine starke Expression dieses viralen Proteins aufweisen. Eine zufriedenstellende Detektion in Mio-M1 Zellen ist leider dennoch nicht möglich; bereits in *Western Blot* Analysen wurde deutlich, dass mit dem 1807 Antikörper, der auch für die Immunfluoreszenzanalysen verwendet wurde, eine wesentlich schlechtere Detektion der verkürzten Proteine erfolgt.

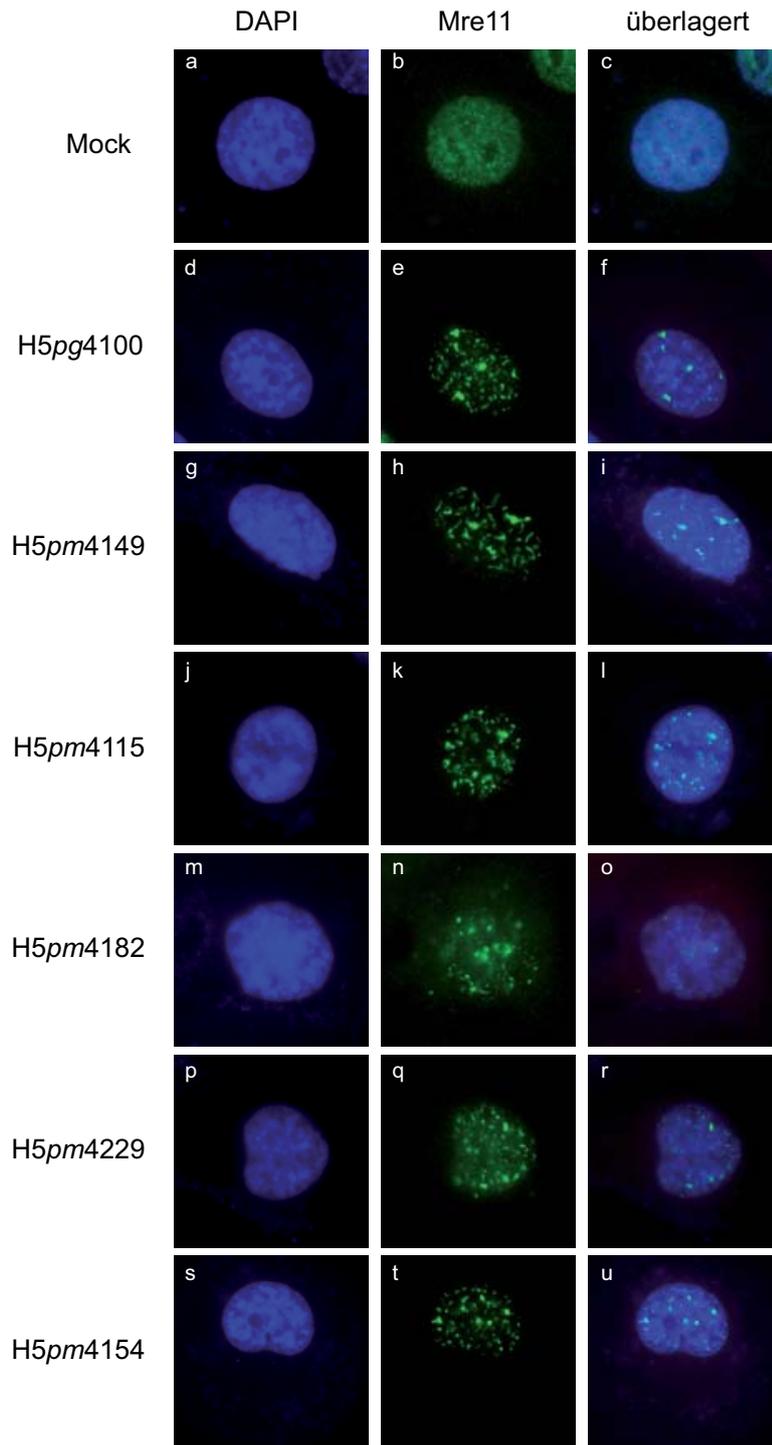
Auch das E1B-55K Protein kann zwischen Zytoplasma und Zellkern pendeln und weist in seiner Lokalisation ein komplexes Muster sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus auf (Ornelles und Shenk, 1991; Smiley *et al.*, 1990). Dieses Muster ist sowohl in mit dem Wildtyp, als auch in mit Virusmutanten infizierten Zellen sichtbar (Abb. 4.7; Bilder g, o, s, w, ab; Abb. 4.8; Bilder g, o, s, w, ab), jedoch liegt das Gleichgewicht des Proteins in Wildtypvirus-infizierten Zellen auf der nukleären Seite (Abb. 4.7; Bild g; Abb. 4.8; Bild g). In Anwesenheit eines funktionellen E4orf6 Proteins wird hier der Transport des Proteins in den Kern unterstützt (Liu *et al.*, 2005; Ornelles und Shenk, 1991). Bei den Virusmutanten H5pm4115 und H5pm4154 ist kein funktionelles bzw. kein E4orf6 Protein vorhanden, die Verteilung von E1B-55K ist hier hauptsächlich zytoplasmatisch (Abb. 4.7; Bilder o, ab; Abb. 4.8; Bilder o, ab). Für die Viren H5pm4182 und H5pm4229 ergeben sich bei der intrazellulären Verteilung von E1B-55K Unterschiede zwischen diesen beiden Viren sowie den untersuchten Zelllinien. Während das E1B-55K Protein bei dem H5pm4229 Virus in H1299 Zellen ebenfalls hauptsächlich im Zytoplasma zu finden ist (Abb. 4.8; Bild w), befindet sich ein Teil dieses viralen Proteins des H5pm4182 Virus als granuläre Strukturen im Zellkern (Abb. 4.8; Bild s). In A549 Zellen dagegen lokalisieren die Proteine beider Virusmutanten sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus und liegen dort in großflächigen, meist punktförmigen, runden Strukturen, vor (Abb. 4.7; Bilder s, w), bei denen es sich vermutlich um die viralen Replikationszentren handelt. Wie frühere Studien zeigen konnten, ist das E1B-55K Protein abhängig von E4orf6 in der Lage, an die Peripherie dieser viralen Transkriptions- und Replikationszentren zu gelangen (Ornelles und Shenk, 1991).

Neben den beiden viralen Proteinen E4orf6 und E1B-55K wurde auch die subzelluläre Verteilung der zellulären Proteine p53 und Mre11 untersucht. Sowohl Mre11 als auch p53 sind in nicht infizierten Zellen diffus im Zellkern verteilt, wobei die Expression von p53 kaum detektierbar ist (Abb. 4.9; Bilder b, c; Abb. 4.10; Bild b). In Zellen, die mit dem Wildtypvirus infiziert wurden, kann, bedingt durch proteasomalen Abbau, teilweise weniger p53 und Mre11 nachgewiesen werden (Abb. 4.9; Bilder f, g; Abb. 4.10; Bild e). In allen untersuchten Virusmutanten erfolgt, wie mittels *Western Blot* gezeigt werden konnte, kein Abbau der beiden zellulären Proteine. Mre11 lokalisiert bei allen untersuchten Viren in fädigen Strukturen im Nukleus (Abb. 4.9; Bilder f, j, n, r, v, z; Abb. 4.10; Bilder e, h, k, n, q, t). Diese Lokalisation ist abhängig vom E4orf3 Protein, das in der Lage ist, das zelluläre Protein in die so genannten nukleären *tracks* oder perinukleäre Aggregate umzulokalisieren (Stracker *et al.*, 2002; Araujo *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005). Die Analysen zeigen damit, dass Veränderungen oder die Abwesenheit von E4orf6 keine Auswirkungen auf die Mre11 Lokalisation haben (Abb. 4.9; Bilder

h, k, n, q, t).



**Abbildung 4.9: Fluoreszenzmikroskopische Analyse infizierter A549 Zellen.** Es wurde die subzelluläre Lokalisation von p53 und Mre11 untersucht. Die Zellen wurden mit H5pg4100 sowie den Virusmutanten H5pm4149, H5pm4115, H5pm4182, H5pm4229 und H5pm4154 infiziert (moi 25), nach 24 h mit Methanol fixiert und mit Antikörpern gegen p53 (Do1) und Mre11 sowie den entsprechenden Sekundärantikörpern detektiert. Die Zellkerne sind mit DAPI sichtbar gemacht worden.



**Abbildung 4.10: Fluoreszenzmikroskopische Analyse infizierter H1299 Zellen.** Es wurde die subzelluläre Lokalisation von Mre11 untersucht. Die Zellen wurden mit H5pg4100 sowie den Virusmutanten H5pm4149, H5pm4115, H5pm4182, H5pm4229 und H5pm4154 infiziert (moi 25), nach 24 h mit Methanol fixiert und mit dem Antikörper gegen Mre11 sowie dem entsprechenden Sekundärantikörper detektiert. Die Zellkerne sind mit DAPI sichtbar gemacht worden.

Auch p53 akkumuliert in perinukleären Aggregaten, sofern es durch ein funktionelles E1B-55K Protein beeinflusst wird, ansonsten ist dieses Protein diffus im Nukleus verteilt (Härtl *et al.*,

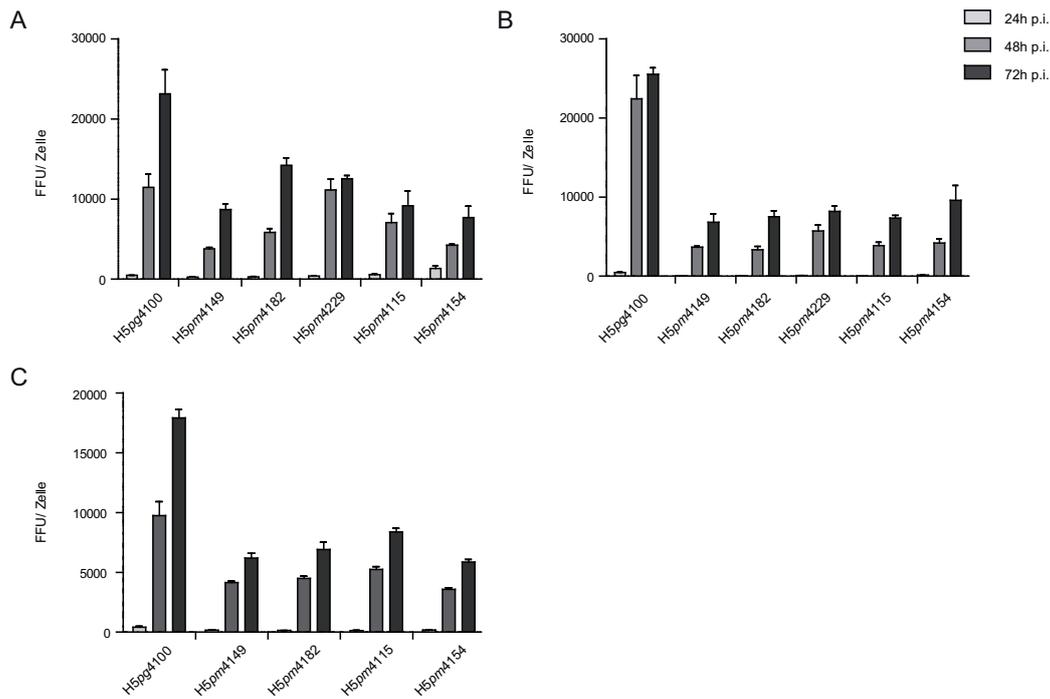
2008; Ornelles und Shenk, 1991). Bei den beschriebenen perinukleären Strukturen handelt es sich um zytoplasmatische Aggresomen, die in der Nähe des MTOC entstehen und neben E1B-55K weitere mit diesem Protein assoziierte Proteine enthalten können. Die Umlokalisierung von beispielsweise p53 und Mre11 zu diesen Strukturen inhibiert die Funktionen der zellulären Proteine (Araujo *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005). Konsistent dazu ist p53 in A549 Zellen in den untersuchten Virusmutanten zum Teil im Zellkern verteilt, zum Teil im Zytoplasma akkumuliert, wobei sich keine deutlichen Unterschiede bei den verschiedenen E4orf6 Mutanten ergeben (Abb. 4.9; Bilder o, s, w, ab).

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass die Mutationen im E4orf6 Protein bei den Viren H5pm4182 und H5pm4229, verglichen mit den Viren H5pg4100, H5pm4115 und H5pm4149, die subzelluläre Lokalisation von E4orf6 nicht wesentlich beeinflussen (Abb. 4.7, Abb. 4.8). Auch die subzelluläre Verteilung von Mre11 und p53 wird nicht durch die Mutationen im E4orf6 Protein der Viren H5pm4182 und H5pm4229 beeinträchtigt (Abb. 4.9, Abb. 4.10). Im Gegensatz dazu haben die Mutationen im E4orf6 Protein dieser Viren aber Auswirkungen auf die subzelluläre Lokalisation von E1B-55K, da die effiziente Umlokalisierung dieses Proteins in den Zellkern nicht mehr gegeben ist (Abb. 4.7, Abb. 4.8). Abhängig vom Zelltyp ergeben sich Unterschiede in der Fähigkeit von E4orf6, die intrazelluläre Verteilung von E1B-55K zu beeinflussen.

#### 4.1.2.4 Produktion von Nachkommenviren

Zur weiteren Analyse der hergestellten Virusmutanten wurde die Syntheserate infektiöser Virusnachkommen ermittelt. Hierfür wurden die Zellen mit dem Wildtypvirus und den Virusmutanten H5pm4149, H5pm4115, H5pm4182, H5pm4229 und H5pm4154 infiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Durch Titration auf W162 Zellen konnte die Menge der infektiösen Viruspartikel ermittelt werden (s. 3.5.5). Aus Abbildung 4.11 ist ersichtlich, dass alle untersuchten Virusmutanten, verglichen mit dem Wildtyp, eine reduzierte Nachkommenvirusproduktion besitzen.

In allen getesteten Zellen weisen die E1B-55K- und E4orf6-negativen Viren den größten Defekt auf. Die Zahl der Virusnachkommen bei den Mutanten H5pm4115, H5pm4182 und H5pm4229 variiert dagegen abhängig von den verwendeten Zellen. So sind alle drei Virusmutanten in H1299 Zellen (Abb. 4.11 B) ebenso defekt wie Viren ohne E1B-55K oder E4orf6. Auch in Mio-M1 Zellen ist die Zahl der produzierten Nachkommenviren des H5pm4229 Virus ebenso gering wie in den E1B-55K- und E4orf6-Nullmutanten, während ihre Zahl beim H5pm4182 Virus etwas größer ist (Abb. 4.11 C). In A549 Zellen dagegen liegt die Nachkommenzahl der Viren H5pm4182 und H5pm4229 über der der Nullmutanten, jedoch deutlich unter der des Wildtypvirus (Abb. 4.11 A). Die verkürzten E4orf6 Proteine sind demnach in A549 Zellen teilweise funktional, während sie in H1299 und Mio-M1 Zellen die effiziente Produktion von Virusnachkommen nicht unterstützen können. Bereits bei der Analyse der Expression der späten viralen Strukturproteine (Abb. 4.5) konnte eine gegenüber den Nullmutanten erhöhte Expression in A549 Zellen, aber nicht in H1299 und Mio-M1 Zellen beobachtet werden.



**Abbildung 4.11: Analyse der Produktion von Nachkommenviren in infizierten Zellen.**

Es wurden A549 (A), H1299 (B) und Mio-M1 (C) Zellen mit H5pg4100 sowie den Virusmutanten H5pm4149, H5pm4115, H5pm4182, H5pm4229 und H5pm4154 infiziert (A549 und H1299: moi 10, Mio-M1: moi 200), zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und Nachkommenviren isoliert. Die Titration erfolgte auf W162 Zellen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass in den neu generierten Virusmutanten H5pm4182 und H5pm4229 verkürzte E4orf6 Proteine der erwarteten Größe zwar exprimiert werden, jedoch deutlich schwächer als im Wildtypvirus oder anderen Virusmutanten (Abb. 4.3). Die subzelluläre Lokalisation des Proteins wird durch die Mutation allerdings nicht beeinträchtigt (Abb. 4.7, Abb. 4.8). Ebenso zeigt sich kein Effekt auf die Synthese der frühen viralen Proteine E2A und E1B-55K, während erhöhte E1A Expressionsspiegel in E4orf6-Virusmutanten vorliegen (Abb. 4.4). Die Funktion von E4orf6, E1B-55K an die Peripherie der viralen Replikationszentren im Zellkern zu lokalisieren, wird von den neu generierten Virusmutanten nur teilweise und Zelltyp-abhängig erfüllt (Abb. 4.7, Abb. 4.8). Schließlich ist die Produktion von späten Strukturproteinen stark reduziert (Abb. 4.5) und ein Abbau von Mre11 und p53 erfolgt nicht (Abb. 4.6). Dies hat eine deutliche Reduktion der Produktion von infektiösen Virusnachkommen zur Folge (Abb. 4.11). Die Onkodomäne von E4orf6 scheint demnach nicht ausreichend zu sein, alle Funktionen von E4orf6 für eine produktive Infektion zu erfüllen.

## 4.2 Identifizierung von HoxB7 als Interaktionspartner der E4orf6 Onkodomäne

Wie bereits erwähnt, ist der C-Terminus des E4orf6 Proteins, die Onkodomäne, ausreichend, die transformierenden Eigenschaften des Proteins zu erfüllen. Nachdem die Funktionen zu-

nächst ausschließlich mit der Relokalisation oder Destabilisierung des Tumorsuppressors p53 begründet wurden (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1999a), scheinen darüber hinaus jedoch weitere Mechanismen eine Rolle zu spielen. Auch für das virale Onkogen E6 des Humanen Papillom Virus 16 (HPV16) konnte neben dem proteasomalen Abbau von p53 ein weiterer p53-unabhängiger Mechanismus der Transformation aufgedeckt werden (Liu *et al.*, 1999; Inoue *et al.*, 1998). Gleiches gilt für das E1B-55K Protein, welches neben der Blockierung der p53-abhängigen Transkription vermutlich auch durch p53-unabhängige Mechanismen, wie die Modulation von Mre11 (Härtl *et al.*, 2008) oder Daxx (Sieber und Dobner, 2007; Schreiner *et al.*, 2010), zur Transformation führt. Auch bei der E4orf6 vermittelten Transformation sind alternative Mechanismen denkbar. In früheren Studien konnten bisher unbekannte zelluläre Interaktionspartner von E4orf6 gefunden werden (Boivin *et al.*, 1999), die möglicherweise an der E4orf6-vermittelten Transformation beteiligt und für den lytischen Replikationszyklus von Adenoviren wichtig sind. Es ist daher von Interesse, diese zellulären Interaktionspartner zu identifizieren. In diesem Teil der Arbeit sollte unter Verwendung des Hefe-Zwei-Hybrid Systems der *Screen* einer genomischen Bibliothek erfolgen. Der *Screen* wurde, wie unter 3.2.1 beschrieben, mit der Onkodomäne von E4orf6 als Suchprotein gegen eine genomische B-Zell-Bibliothek durchgeführt. Die gefundenen interagierenden Proteine sowie einige ihrer in der Literatur beschriebenen Charakteristika sind in Tab. 4.1 aufgeführt.

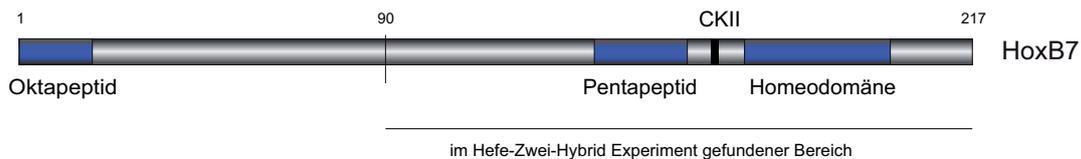
**Tabelle 4.1: Interaktionspartner der E4orf6 Onkodomäne.** Die genannten Proteine wurden im Hefe-Zwei-Hybrid *Screen* als mögliche Interaktionspartner identifiziert. Ihre *Acession* Nummer sowie einige Funktionen sind angegeben. Eine genauere Erklärung sowie Literaturangaben sind dem Text zu entnehmen.

Identifiziertes Protein	<i>Acession</i> Nummer	Funktion
HIC p40	NM001166345	Mitglied der I-mfa Proteinfamilie; involviert in Zelldifferenzierung und Embryonalentwicklung; HIC reguliert Transkription viraler Promotoren.
eEF1B $\gamma$	NM001404	Translations-Elongationsfaktor; dabei Austauschfaktor für eEF1A, der beladene tRNAs zum Ribosom transportiert; bindet RNA; interagiert mit RNA Polymerase II.
HoxB7	NM004502	Mitglied der Homeobox-Proteinfamilie; wichtig für Embryonal- und Organentwicklung; veränderte Expression in Tumoren.

Das Protein HIC p40 (*human I-mfa-domain containing protein*) weist große Ähnlichkeit zu I-mfa (*inhibitor of MyoD family*) Proteinen auf, welche als Inhibitoren von *MyoD* (Myogener Faktor 3) und verwandten myogenen Transkriptionsfaktoren wirken (Thebault *et al.*, 2000). HIC selbst kann die Transkription viraler Promotoren regulieren. Während es die Transkription des HTLV-I LTR stimuliert, hat es einen negativen Einfluss auf die Transkription des HIV-1 LTR (Thebault *et al.*, 2000; Gautier *et al.*, 2005).

Der eukaryotische Translations-Elongationsfaktor eEF1B $\gamma$  ist an der Translation von Proteinen beteiligt. Er gehört zum eEF1B-Komplex, der als Austauschfaktor für eEF1A fungiert, welcher wiederum den Transfer von aminoacylierten tRNAs zu Ribosomen katalysiert.

eEF1B $\gamma$  ist hierbei vermutlich für die Assemblierung des eEF1B-Komplexes und dessen Interaktion mit eEF1A verantwortlich (Browne und Proud, 2002). Darüber hinaus wurde die Bindung von eEF1B $\gamma$  an RNAs (Al-Maghrebi *et al.*, 2002) und eine Interaktion mit einer Untereinheit der RNA Polymerase II beobachtet. Es wird daher angenommen, dass eEF1B $\gamma$  zusätzlich eine bisher unbekannte Rolle im RNA Metabolismus spielt (Corbi *et al.*, 2010). HoxB7 gehört zur Familie der Homeobox Proteine und spielt bei der Embryonal- aber auch bei der Organentwicklung eine entscheidende Rolle (Pearson *et al.*, 2005; Grier *et al.*, 2009; Mark *et al.*, 1997). Die Fehlregulation verschiedener Hox Proteine wurden vermehrt mit Tumorentstehung in Verbindung gebracht (Giampaolo *et al.*, 2002; Lawrence *et al.*, 2005; Lechner *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2003). Auch HoxB7 konnte als eines, der in Tumoren fehlregulierten Hox Proteine, identifiziert werden (Wu *et al.*, 2006; Naora *et al.*, 2001; Care *et al.*, 1996). Eine ausführlichere Beschreibung der Funktionen von Hox Proteinen bzw. HoxB7 ist 1.3 zu entnehmen. Der im Hefe-Zwei-Hybrid Experiment identifizierte Bereich von HoxB7, der mit E4orf6 interagiert, umfasst die Nukleotide 372 bis 1170 der HoxB7 mRNA. Dies entspricht den C-terminalen 127 Aminosäuren des HoxB7 Proteins. Eine schematische Darstellung der darin enthaltenen funktionellen Bereiche ist in Abbildung 4.12 zu sehen.



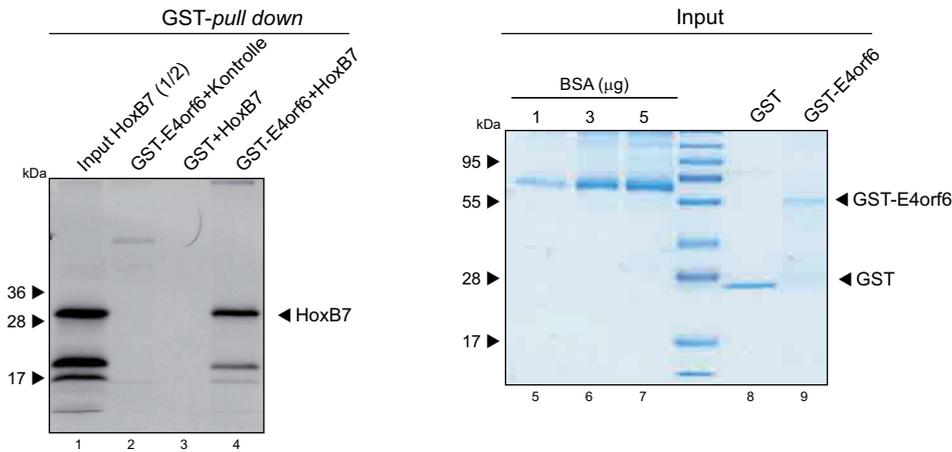
**Abbildung 4.12: Schematische Darstellung von HoxB7.** Dargestellt sind einige funktionelle Bereiche im HoxB7 Protein sowie der im Hefe-Zwei-Hybrid Experiment identifizierte Interaktionsbereich mit E4orf6. CKII: Casein KinaseII-Phosphorylierungsstelle (nach Yaron *et al.*, 2001).

### 4.3 Analysen zur Interaktion von HoxB7 mit E4orf6

#### 4.3.1 E4orf6 interagiert mit HoxB7 *in vitro*

Nachdem HoxB7 im Hefe-Zwei-Hybrid Experiment als Interaktionspartner von E4orf6 identifiziert werden konnte, sollte diese Interaktion nun verifiziert und weiter analysiert werden. Dafür wurde zunächst in einem GST-*pull down* Experiment die Interaktion beider Proteine *in vitro* überprüft. Hierfür wurde E4orf6 als Fusionsprotein mit GST in *E.coli* Zellen exprimiert (s. 3.8.1) und mit *in vitro* translatiertem radioaktiv markiertem HoxB7 (s. 3.8.2) inkubiert (s. 3.8.8.1). Es erfolgte die Auftrennung der Proteine durch SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese (s. 3.8.5) und Autoradiographie der getrockneten Gele (s. 3.8.7.2). Wie in Abb. 4.13 zu sehen, konnte eine Interaktion zwischen HoxB7 und GST-E4orf6 nachgewiesen werden (Abb. 4.13; Spur 4), während das zelluläre Protein nicht an GST alleine bindet

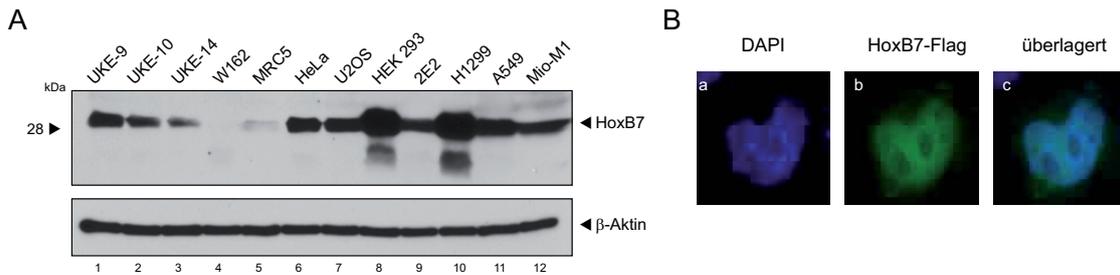
(Abb. 4.13; Spur 3). Auch eine unspezifische Interaktion eines *in vitro* translatierten Kontrollproteins mit E4orf6 konnte nicht beobachtet werden (Abb. 4.13; Spur 2).



**Abbildung 4.13: Interaktion von HoxB7 mit E4orf6 *in vitro*.** *In vitro* translatiertes, [<sup>35</sup>S]-markiertes HoxB7 oder Luciferase als Kontrolle wurde zusammen mit 3 µg GST-E4orf6 oder GST in einem GST-pull down Experiment eingesetzt. Die Proteine wurden über 12%ige SDS-Gele aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. Die halbe Menge HoxB7 als Input wurde direkt aufgetragen. Die GST-Proteine wurden zur Mengenabschätzung (anhand von BSA) zuvor über 12%ige SDS-Gele aufgetrennt und durch Coomassiefärbung detektiert.

### 4.3.2 E4orf6 interagiert mit HoxB7 in transient transfizierten Zellen

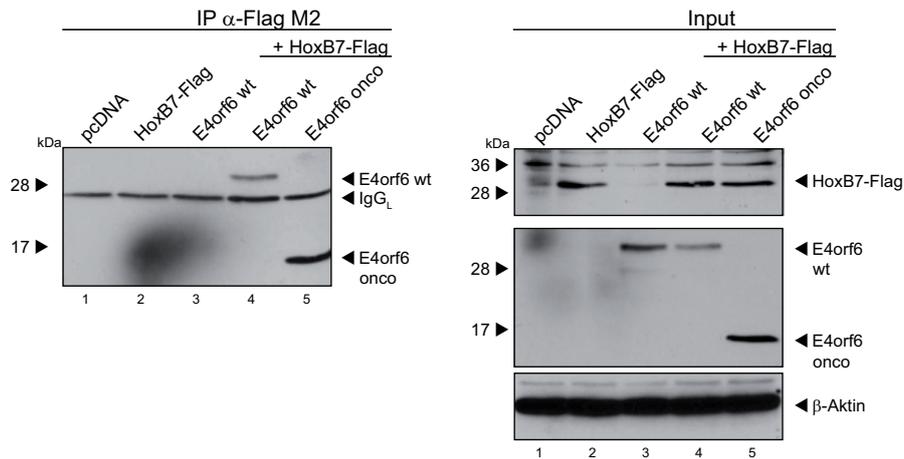
Im nächsten Arbeitsschritt sollte diese Interaktion auch in humanen Zellen bestätigt werden. Zunächst wurde die Expression von HoxB7 in verschiedenen Zelllinien überprüft, um ein geeignetes Modellsystem für die weiteren Versuche zu bestimmen sowie die subzelluläre Lokalisation dieses Proteins zu untersuchen. Hierfür wurden aus verschiedenen humanen Zelllinien und einer Affenzelllinie Gesamtzelllysate hergestellt (s. 3.8.3) und diese mittels *Western Blot* hinsichtlich der Expression von HoxB7 analysiert. Wie die Abb. 4.14 A zeigt, ist in den untersuchten Zelllinien eine gesteigerte HoxB7 Expression in H1299 und HEK 293 Zellen zu beobachten. In MRC5 und W162 Zellen wird das Protein nur schwach exprimiert. W162 sind Affenzellen und weisen möglicherweise ein, dem humanen HoxB7 gegenüber, verändertes Protein auf. Trotz hoher evolutiver Konserviertheit der Hox Proteine (Gehring, 1993; Zhang und Nei, 1996) kann der Antikörper das HoxB7 Protein in diesen Zellen vermutlich nicht erkennen. In der Literatur ist eine erhöhte Expression von HoxB7 in Lungentumorzelllinien und Lungentumoren bereits beschrieben (Plowright *et al.*, 2009) und erklärt die starke Expression in den H1299 Zellen (humane Lungenkarzinomzellen). Neben dem Expressionsspiegel wurde nun auch die subzelluläre Lokalisation von HoxB7 bestimmt. Dazu wurde Flag-markiertes HoxB7 in H1299 Zellen transfiziert (s. 3.3.4.1) und die Lokalisation des Fusionsproteins mit dem Flag-Antikörper mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Die Verteilung des Proteins in der Zelle ist, konsistent mit der Literatur (Yaron *et al.*, 2001), diffus im Nukleus (Abb. 4.14 B).



**Abbildung 4.14: Analyse der Expression und Lokalisation von HoxB7.** **A** Aus verschiedenen Zelllinien wurden Gesamtzellextrakte hergestellt. Zur Überprüfung der Expression wurden diese (150  $\mu$ g HoxB7 und 20  $\mu$ g  $\beta$ -Aktin) mittels 12%iger SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen HoxB7 und  $\beta$ -Aktin (AC-15) als Ladekontrolle sowie den entsprechenden HRPO-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert. **B** Die Zellen wurden mit HoxB7-Flag transfiziert, nach 24 h mit Methanol fixiert und mit einem Antikörper gegen das Flag-Epitop (Flag-M2) sowie dem entsprechenden Sekundärantikörper detektiert. Der Zellkern ist mit DAPI sichtbar gemacht worden.

Für die weiteren Interaktionsstudien in humanen Zellen wurde die Zelllinie H1299 gewählt, da sie eine starke Expression von HoxB7 zeigt und ein etabliertes System für Arbeiten mit Adenoviren darstellt.

Zur Analyse der Interaktion von HoxB7 und E4orf6 in humanen Zellen wurden zunächst Plasmide, die für HoxB7-Flag und E4orf6-HA kodieren in H1299 Zellen transfiziert (s. 3.3.4.1). Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet und Gesamtzellextrakte hergestellt (s. 3.8.3). Nach Kopräzipitation mit dem Flag-Antikörper (s. 3.8.8.2) wurden die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (s. 3.8.5) und anschließend durch *Western Blot* detektiert (s. 3.8.6). Aus der Abb. 4.15 ist ersichtlich, dass in den transfizierten Zellen eine Interaktion zwischen HoxB7-Flag und E4orf6-HA stattfindet. Dabei kann sowohl das Volllänge-E4orf6 Protein (Abb. 4.15; Spur 4) als auch das C-terminale Fragment (Abb. 4.15; Spur 5) durch HoxB7-Flag kopräzipitiert werden. Dies bestätigt die Ergebnisse aus dem Hefe-Zwei-Hybrid Experiment (vgl. 4.2) sowie dem GST-*pull down* Experiment (Abb. 4.13) und zeigt, dass auch in humanen Zellen eine Interaktion der beiden Proteine erfolgt.



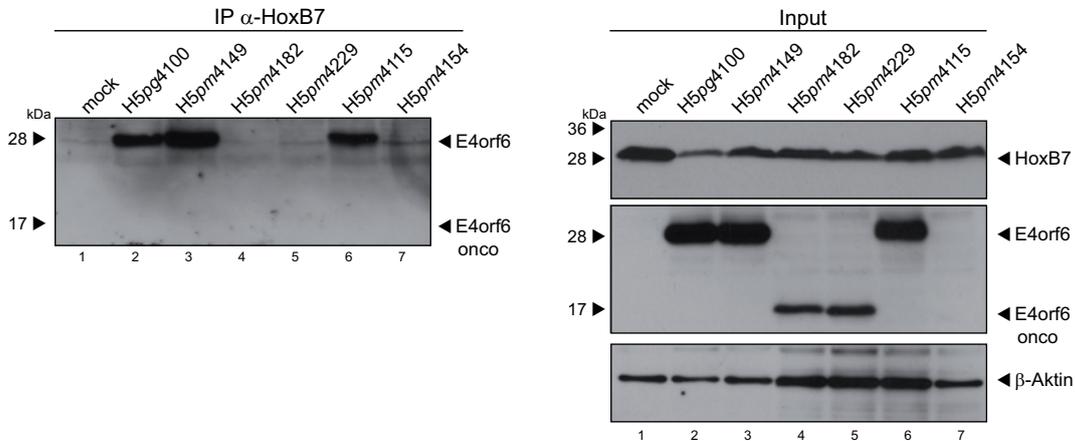
**Abbildung 4.15: Interaktion von HoxB7 mit E4orf6 in transfizierten H1299 Zellen.**

Die Zellen wurden transfiziert, 48 h p.t. geerntet und Gesamtzellextrakte hergestellt. Zur Überprüfung der Expression wurden diese (40 µg E4orf6-HA, 80 µg HoxB7-Flag und 20 µg β-Aktin) mittels 12%iger SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen E4orf6-HA (3F10), HoxB7-Flag (Flag-M2) und β-Aktin (AC-15) als Ladekontrolle sowie den entsprechenden HRPO-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert. Zur Koimmunpräzipitation wurden 2 mg Zellysat zuvor mit dem Flag-M2-Antikörper immunpräzipitiert, über 12%ige SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit einem Antikörper gegen E4orf6-HA (3F10) sowie dem entsprechenden HRPO-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert.

### 4.3.3 E4orf6 interagiert mit endogenem HoxB7 in infizierten Zellen

Nachdem eine Interaktion von E4orf6 und HoxB7 bei exogener Expression dieser Proteine bestätigt wurde, war es von Interesse, diese Interaktion unter den physiologischen Bedingungen einer Virusinfektion zu analysieren. Hierfür wurden H1299 Zellen mit dem Wildtypvirus sowie den Virusmutanten H5pm4149, H5pm4115, H5pm4182, H5pm4229 und H5pm4154 infiziert und nach 24 h geerntet. In diesem Experiment wurde mit dem Antikörper gegen endogenes HoxB7 präzipitiert und E4orf6 nachgewiesen. Die Abb. 4.16 zeigt, dass eine Interaktion zwischen dem endogenen HoxB7 und dem E4orf6 Wildtyp Protein stattfindet (Abb. 4.16; Spur 2). Dass das E4orf6 Protein der Virusmutante H5pm4149 ebenfalls mit HoxB7 interagiert (Abb. 4.16; Spur 3), zeigt, dass die Bindung beider Proteine unabhängig von E1B-55K erfolgt, da sie auch in Abwesenheit dieses viralen Proteins detektiert wird. Hier scheint sogar mehr E4orf6 kopräzipitiert werden zu können als im Wildtypvirus. Zur Kompensation der geringen Expression der E4orf6 Proteine der Virusmutanten H5pm4115, H5pm4182 und H5pm4229 wurde hier eine größere Menge Zellysat für die Kopräzipitation eingesetzt. Nicht nur die unveränderten E4orf6 Proteine der bereits erwähnten Viren, sondern auch das E4orf6 Protein des H5pm4115 Virus ist in der Lage, mit HoxB7 zu interagieren (Abb. 4.16; Spur 6). Dagegen kann trotz der größeren Menge der verkürzten E4orf6 Proteine der Virusmutanten H5pm4182 und H5pm4229 keine Kopräzipitation durch HoxB7 beobachtet werden (Abb. 4.16; Spuren 4, 5). Möglicherweise ist die Konformation dieser Proteine durch Deletion des zentralen Pro-

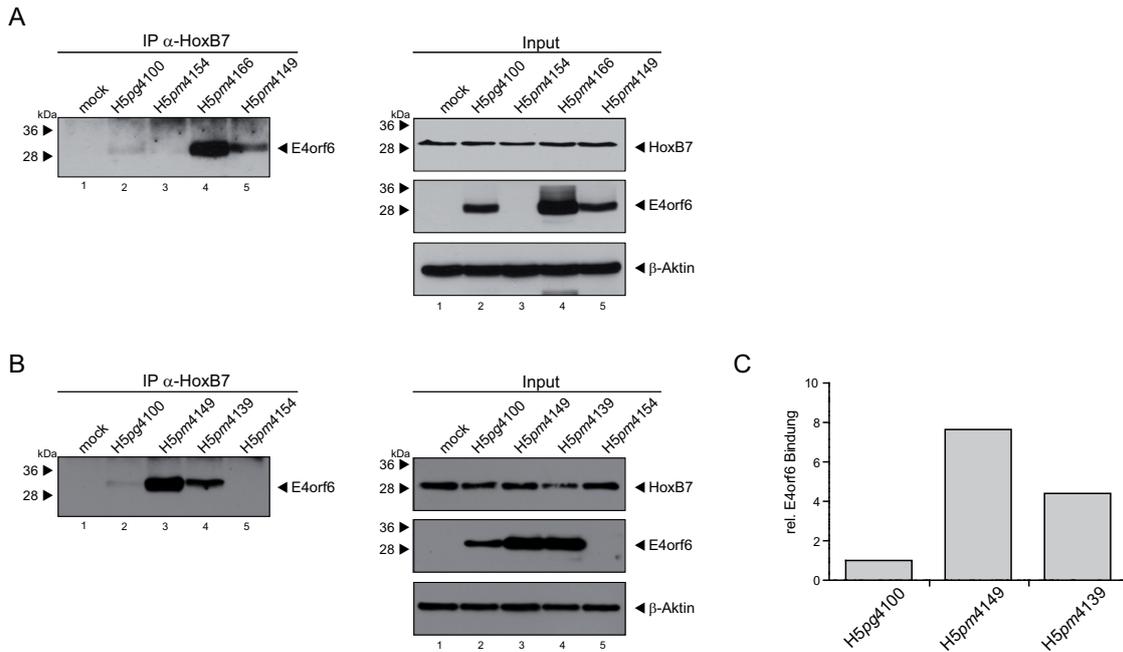
teinfragments so verändert, dass die Binderegion für HoxB7 nicht mehr zugänglich ist. Da der C-Terminus alleine stabil zu sein scheint und mit HoxB7 interagieren kann (s. 4.3.2), ist möglicherweise der N-Terminus für den Verlust der Bindung verantwortlich.



**Abbildung 4.16: Interaktion von HoxB7 mit E4orf6 in infizierten H1299 Zellen.** Die Zellen wurden mit H5pg4100, H5pm4149, H5pm4115, H5pm4182, H5pm4229 und H5pm4154 infiziert, 24 h p.i. geerntet und Gesamtzellextrakte hergestellt. Zur Überprüfung der Expression wurden diese (150 µg HoxB7; 40 µg E4orf6, bei H5pm4115, H5pm4182, H5pm4229 80 µg; 20 µg β-Aktin, bei H5pm4115, H5pm4182, H5pm4229 40 µg) mittels 12%iger SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen E4orf6 (1807), HoxB7 und β-Aktin (AC-15) als Ladekontrolle sowie den entsprechenden HRPO-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert. Zur Koimmunpräzipitation wurden 5 mg Zellysat (10 mg bei H5pm4115, H5pm4182, H5pm4229) zuvor mit dem HoxB7-Antikörper immunpräzipitiert, über 12%ige SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit dem Antikörper gegen E4orf6 (1807) sowie dem entsprechenden HRPO-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert.

Ein möglicher Einfluss von E1B-55K auf die Interaktion von HoxB7 mit E4orf6 sollte im Folgenden genauer untersucht werden. Dazu wurden H1299 Zellen mit dem Wildtypvirus H5pg4100 und den Virusmutanten H5pm4149, H5pm4166, H5pm4139 und H5pm4154 infiziert und nach 24 h geerntet. Die Zellyse und Immunpräzipitation mit dem endogenen HoxB7-Antikörper wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt. Die bereits im vorherigen Experiment beobachtete Interaktion von E4orf6 und HoxB7 konnte hier bestätigt werden (Abb. 4.17 A; Spur 2, B Spur 2). In der Abb. 4.17 A; Spur 4 ist zu sehen, dass in der Virusmutante ohne E4orf4 (H5pm4166) konsistent mit Literaturangaben (Miron *et al.*, 2009) mehr E4orf6 als in allen andern Virusmutanten exprimiert wird und daher auch eine größere Menge des Proteins kopräzipitiert werden kann. Auffällig ist die bereits vorher beobachtete verstärkte Interaktion zwischen HoxB7 und E4orf6 in Abwesenheit von E1B-55K (Abb. 4.17 A; Spur 5, B Spur 3).

Um eine quantitative Aussage über die Stärke der Interaktion der beiden Proteine machen zu können, wurden die Bandenintensitäten von E4orf6 im Input sowie in der Kopräzipitation densitometrisch ausgewertet und verglichen. Wie in der Abb. 4.17 C zu sehen, ist die Menge an kopräzipitiertem E4orf6 in der H5pm4149 Mutante gegenüber dem Wildtyp achtfach erhöht. Auch bei der Virusmutante H5pm4139, deren E4orf6 Protein nicht mehr mit den zellulären



**Abbildung 4.17: Interaktion von HoxB7 mit E4orf6 in infizierten H1299 Zellen. A, B** Die Zellen wurden mit H5pg4100, H5pm4149, H5pm4166, H5pm4139 und H5pm4154 infiziert, 24 h p.i. geerntet und Gesamtzellextrakte hergestellt. Zur Überprüfung der Expression wurden diese (150 µg HoxB7, 40 µg E4orf6, 20 µg β-Aktin) mittels 12%iger SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen E4orf6 (1807), HoxB7 und β-Aktin (AC-15) als Ladekontrolle sowie den entsprechenden HRPO-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert. Zur Koimmunpräzipitation wurden 5 mg Zellysate zuvor mit dem HoxB7-Antikörper immunpräzipitiert, über 12%ige SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit dem Antikörper gegen E4orf6 (1807) sowie dem entsprechenden HRPO-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. **C** zeigt die relative Bindung von E4orf6 und HoxB7 aus Versuch **B**. Die Bandenintensitäten von E4orf6 von Input und der Kopräzipitation wurden densitometrisch bestimmt und ins Verhältnis gesetzt.

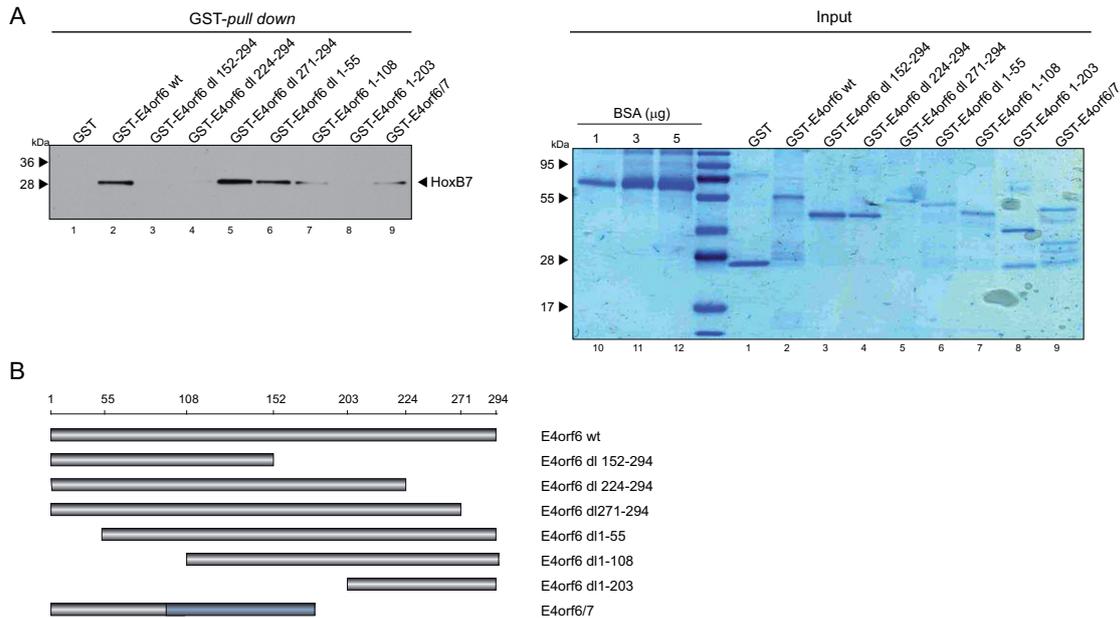
Komponenten des E3-Ubiquitin-Ligase Komplexes interagieren kann, ist eine verstärkte, dem Wildtyp gegenüber vierfache, Interaktion mit HoxB7 zu beobachten (Abb. 4.17 B; Spur 4, C).

Zusammenfassend konnte die zuerst im Hefe-Zwei-Hybrid Experiment identifizierte und *in vitro* bestätigte Interaktion zwischen E4orf6 und HoxB7 in humanen Zellen unter physiologischen Bedingungen während einer Virusinfektion bestätigt werden.

#### 4.3.4 Identifizierung der HoxB7 Binderegion im E4orf6 Protein

Im Anschluss sollte nun die Region im E4orf6 Protein identifiziert werden, die für die Interaktion verantwortlich ist. Hierfür wurden GST-E4orf6 Proteine hergestellt, die unterschiedliche Deletionen im Protein enthalten (Abb. 4.18 B). Aus mit HoxB7-Flag transfizierten Zellen wurde Gesamtzellextrakt hergestellt, welcher mit den GST Proteinen inkubiert wurde. Wie aus der Abb. 4.18 A ersichtlich, binden die Proteine mit Deletionen der Aminosäuren 152-294, 224-294 und 1-203 nicht mehr an das markierte HoxB7 Protein (Abb. 4.18 A; Spuren 3, 4, 8),

das E4orf6 Protein mit einer Deletion der Aminosäuren 1-108 nur sehr schwach (Abb. 4.18 A; Spur 7).



**Abbildung 4.18: Bestimmung des HoxB7 Interaktionsbereichs im E4orf6 Protein.**

H1299 Zellen wurden mit HoxB7-Flag transfiziert, die Zellen geerntet und Gesamtzelllysat hergestellt. Dieses wurde zusammen mit 3 µg GST-E4orf6 oder GST in einem GST-*pull down* Experiment eingesetzt. Die Proteine wurden über 12%ige SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit einem Antikörper gegen das Flag-Epitop (Flag-M2) inkubiert. Die GST-Proteine wurden zur Mengenabschätzung (anhand von BSA) zuvor über 12%ige SDS-Gele aufgetrennt und durch Coomassiefärbung detektiert.

Im Gegensatz zu den Hefe-Zwei-Hybrid- und Transfektionsexperimenten interagiert der C-Terminus von E4orf6 nicht mit HoxB7. Der GST-Anteil des Fusionsproteins hat eine Größe von ca. 25 kDa und ist damit größer als das C-terminale E4orf6 Protein selbst. Dies könnte eine Konformationsveränderung des Proteins und damit die Blockierung der Binderegion für HoxB7 zur Folge haben. Ähnliches wurde auch bei der Bindung des E4orf6 Proteins des H5pm4182 und H5pm4229 Virus beobachtet. Lässt man diese Diskrepanz bezüglich der Bindung des C-terminalen Fragments außer Acht, würde die Binderegion für HoxB7 demnach im Bereich zwischen den Aminosäuren 224 und 271 liegen.

Interessanterweise findet vermutlich auch eine Interaktion von HoxB7 mit E4orf6/7 statt, das nur die N-terminalen 58 Aminosäuren von E4orf6 besitzt. Entweder HoxB7 kann mit dem alternativen C-Terminus dieses Fusionsproteins interagieren oder es gibt eine weitere HoxB7 Binderegion im N-Terminus von E4orf6.

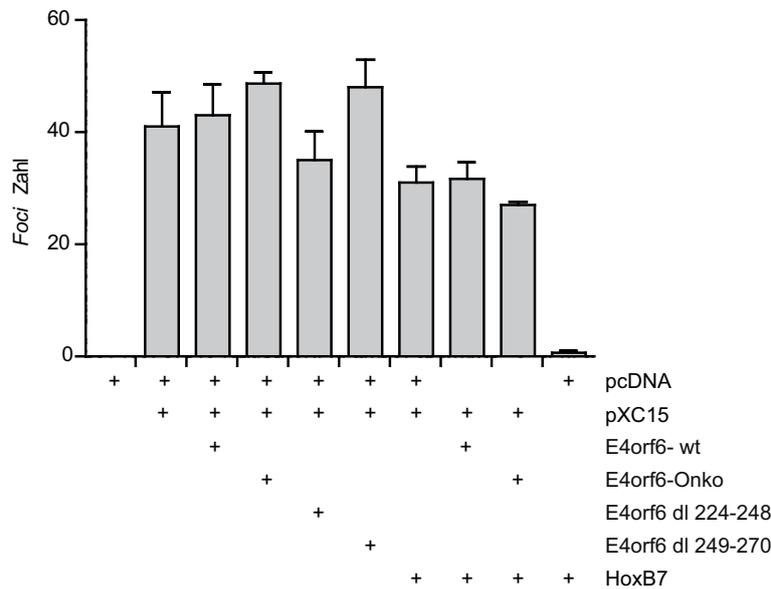
## 4.4 Analyse der Rolle von HoxB7 bei der Transformation durch adenovirale Genprodukte

Nachdem eine Interaktion zwischen HoxB7 und E4orf6 gezeigt werden konnte, sollte diese nun hinsichtlich ihrer Funktionalität für die Transformation untersucht werden. Hox Proteine im Allgemeinen und HoxB7 im Speziellen wurden in der Vergangenheit vermehrt mit Tumorgenese assoziiert (Wu *et al.*, 2006; Naora *et al.*, 2001; Care *et al.*, 1996) und werden von manchen Autoren sogar als Schlüsselproteine hierfür bezeichnet (Lawrence *et al.*, 2005; Fernandez *et al.*, 2008). Darüber hinaus konnte für verschiedene Hox Proteine, darunter auch HoxB7, gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, Nagetierzellen *in vitro* zu transformieren (Maulbecker und Gruss, 1993).

Die transformierenden Eigenschaften adenoviraler Genprodukte können in Transformationsexperimenten mit BRK (*baby rat kidney*) Zellen untersucht werden. Hierbei werden die potentiellen Onkogene in den Nagetierzellen exprimiert und können diese transformieren. Primäre Zellen können in der Zellkultur kaum proliferieren und sterben nach kurzer Zeit ab, während die transformierten Zellen wachstumsfördernde Eigenschaften gewonnen haben und nahezu unbegrenzt expandiert werden können. Anhand der Zahl ausgewachsener Zellkolonien, den so genannten *Foci*, kann die Effizienz der Transformation durch das jeweilige Onkogen bestimmt werden (Nevels und Dobner, 2006). Die adenoviralen Proteine E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 konnten in solchen Transformationsexperimenten als Onkogene identifiziert werden (McLorie *et al.*, 1991; White, 1998; Nevels *et al.*, 1999a,b; Moore *et al.*, 1996), wobei die Genprodukte der E4-Region die Effizienz der E1A- und E1B-vermittelten Transformation deutlich steigern können. Zur Erfüllung der transformationsfördernden Eigenschaften ist der C-Terminus des E4orf6 Proteins, der als Onkodomäne benannt wurde, ausreichend (Nevels *et al.*, 2000).

Ein möglicher Einfluss von HoxB7 auf die adenovirale Transformation wurde in einem Transformationsexperiment mit primären Rattennierenzellen durch Überexpression dieses Proteins sowie durch Verwendung von E4orf6 Mutanten, die Deletionen in der möglichen HoxB7 Binde-region enthalten (s. 4.3.4), untersucht. Primäre Rattennierenzellen wurden hierfür, wie unter 3.3.6 beschrieben, isoliert und mit für adenovirale Proteine bzw. HoxB7 kodierenden Plasmiden transfiziert. Das Medium der Zellen wurde regelmäßig gewechselt und nach fünf Wochen wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt und die Zahl der entstandenen *Foci* und damit die Transformationseffizienz bestimmt (s. 3.3.7). Wie in der Abb. 4.19 zu sehen, ist die Zahl der *Foci* durch zusätzliche Expression von E4orf6 (Volllänge und Onko) gegenüber E1A und E1B alleine etwas erhöht. Dagegen kann in der Literatur fast eine Verdopplung durch Expression dieser E4orf6 Proteine beobachtet werden (Nevels *et al.*, 1997, 2000). Die Expression der E4orf6 Mutante mit Deletion der Aminosäuren 224 bis 248 führt gegenüber dem E4orf6 Wildtyp Protein zu einer um 13% reduzierten Zahl transformierter Zellen, während für die Mutante mit Deletion der Aminosäuren 249 bis 270 kein signifikanter Unterschied zu sehen ist. Weiterhin wird deutlich, dass durch die Überexpression von HoxB7 alleine in den Rattenzellen kaum *Foci* entstehen. Die Koexpression des zellulären Proteins mit den adenoviralen Onkogenen reduziert interessanterweise die *Foci* Zahl im Vergleich zu den jeweiligen Ansätzen

ohne HoxB7. Die Reduktion für E1A und E1B mit dem E4orf6-Onko Protein beträgt dabei etwa 40%, während die Zahl der transformierten Zellen in den anderen Ansätzen um etwa 25% reduziert ist.



**Abbildung 4.19: Analyse des Einflusses von HoxB7 auf die Transformation primärer BRK Zellen.** Primäre BRK Zellen wurden mit Plasmiden, die für E1A und E1B (pXC15), E4orf6, E4orf6-Onko, HoxB7 und E4orf6-Mutanten kodieren, nach der PEI-Methode transfiziert. Nach fünf Wochen wurden die transformierten Zellkolonien mit Kristallviolett gefärbt.

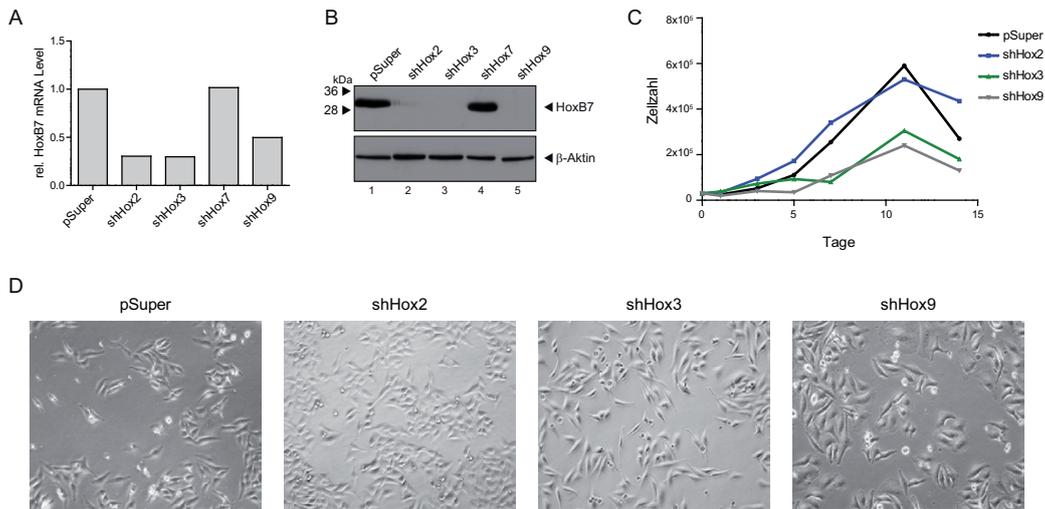
## 4.5 Analysen zur Rolle von HoxB7 im produktiven viralen Replikationszyklus

Nachdem eine Interaktion zwischen E4orf6 und dem zellulären Protein HoxB7 identifiziert werden konnte, sollte der Einfluss dieser Kooperation und damit auch der Einfluss von HoxB7 selbst, auf eine produktive Infektion untersucht werden. Bei dem in dieser Arbeit durchgeführten Transformationsexperiment konnte ein Einfluss von HoxB7 auf die Adenovirus-vermittelte Transformation primärer Rattennierenzellen aufgedeckt werden (vgl. 4.4), weshalb auch ein Einfluss des Proteins auf die virale Replikation denkbar ist.

### 4.5.1 Herstellung und Charakterisierung einer HoxB7 negativen humanen Zelllinie

Zur Herstellung einer HoxB7 negativen Zelllinie wurden die bereits in den Bindungsanalysen verwendeten H1299 Zellen benutzt. Wie unter 3.3.8 beschrieben, wurden Lentiviren hergestellt, die im Vektor pSuper eine shRNA gegen HoxB7 exprimieren. Als Kontrolle diente das leere Vektorkonstrukt. Mit diesen lentiviralen Partikeln wurden die Zellen transduziert und Monoklonale isoliert. Die Effizienz des *knock downs* von HoxB7 in den monoklonalen Zelllinien

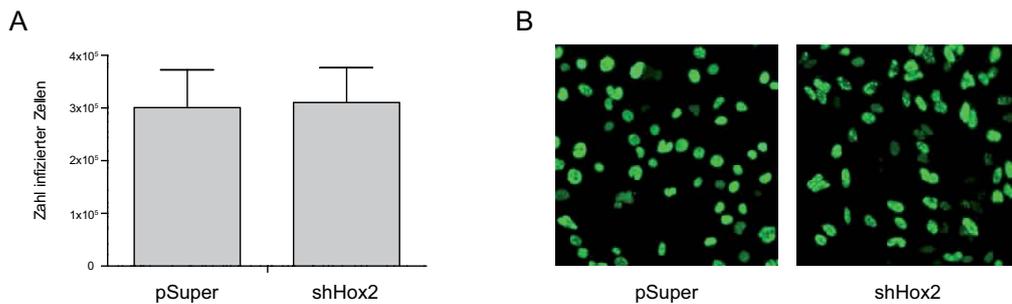
wurde daraufhin mittels quantitativer *Real Time* PCR (s. 3.7.4) und Proteinanalysen durch SDS-Gelelektrophorese (s. 3.8.5) und anschließendem *Western Blot* (s. 3.8.6) analysiert. Aus der Abb. 4.20 A ist ersichtlich, dass drei *knock down* Zelllinien (shHox2, 3 und 9), verglichen mit der Kontrolle pSuper, eine reduzierte HoxB7 mRNA Menge aufweisen. Die Menge der HoxB7 mRNA ist dabei in den Zelllinien shHox2 und shHox3 am geringsten. Dieses Ergebnis konnte auf Proteinebene bestätigt werden. Auch hier zeigen die Zellklone shHox2, shHox3 und shHox9 eine Reduktion des HoxB7 Proteins (Abb. 4.20 B; Spuren 2, 3, 5).



**Abbildung 4.20: Charakterisierung von HoxB7 knock down Zellen.** **A** Aus den *knock down* sowie Kontrollzelllinien wurde mRNA isoliert und diese mittels quantitativer *Real Time* PCR analysiert. **B** Ebenso wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und zur Überprüfung der Expression (150 µg HoxB7 und 20 µg β-Aktin) mittels 12%iger SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen HoxB7 und β-Aktin (AC-15) als Ladekontrolle inkubiert. **C** 2x10<sup>4</sup> Zellen wurden ausgesät, nach verschiedenen Zeitpunkten gerettet und die Zellzahl bestimmt. **D** zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme der Zellen.

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 4.20 D zeigen eine leicht veränderte Morphologie der HoxB7 *knock down* Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen. Besonders die Klone shHox2 und shHox3 weisen eine etwas länglichere Form auf. Wu und Kollegen konnten zeigen, dass HoxB7 die Epithelial-Mesenchymale Transition induzieren kann, nachdem die Überexpression des Proteins in einer epithelialen Zelllinie deren Morphologie von ziegelstein- zu spindelförmig verändert und die Zellen im Zuge der Umwandlung Proteinmarker für Epithelzellen verlieren (Wu *et al.*, 2006). Nachdem es keine Hinweise gibt, dass dies auch bei Reduktion der HoxB7 Expression verursacht wird, wird nicht angenommen, dass diese Veränderung hier vorliegt. Dennoch wurde zur weiteren Charakterisierung der Zelllinien deren Wachstumsverhalten bestimmt. Hierfür wurden die Zellen ausgesät, nach verschiedenen Zeitpunkten mittels Trypsin abgelöst und die Zellzahl bestimmt (s. 3.3.3). Für die Dauer der durchgeführten Versuche (max. drei Tage) zeigen alle Zelllinien ein vergleichbares Wachstumsverhalten (Abb. 4.20 C). Danach wachsen die Klone shHox3 und shHox9 langsamer als der Klon shHox2 und die Kontrollzellen pSuper. Für Versuche mit einer Dauer von max. drei Tagen sind daher alle Klone geeignet.

Aufgrund der leicht veränderten Morphologie der HoxB7 depletierten Zellen sollte die Infizierbarkeit dieser Zellen verglichen mit den Kontrollzellen untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen ausgesät, mit dem Wildtypvirus infiziert (s. 3.5.4) und nach 24 h mit Methanol fixiert (s. 3.9.1). Die Zellen wurden, wie unter 3.5.3 beschrieben, mit dem B6-8 Antikörper gegen das E2A-Protein gefärbt und die Zahl infizierten Zellen bestimmt. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Infizierbarkeit zwischen HoxB7-negativen und Kontrollzellen ermittelt werden (Abb. 4.21).

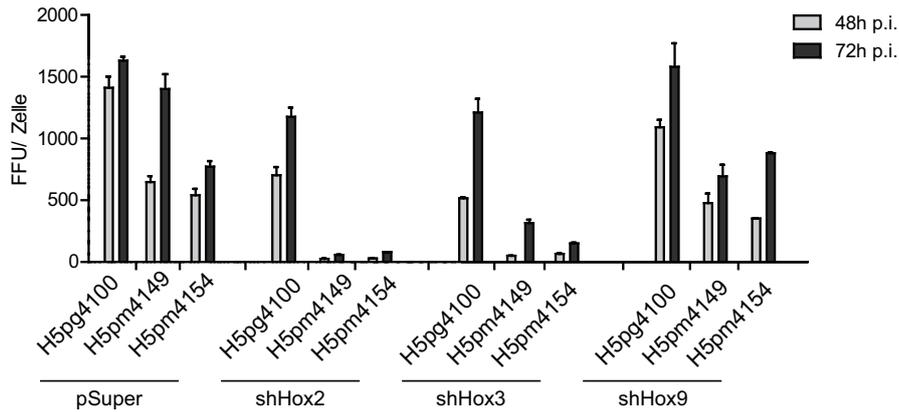


**Abbildung 4.21: Untersuchung der Infizierbarkeit von HoxB7 *knock down* Zellen.** **A** Es wurden *knock down* sowie Kontrollzelllinien mit H5pg4100 Viren infiziert, nach 24 h mit Methanol fixiert und mit dem Antikörper B6-8 sowie dem geeigneten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper gefärbt. Die Zahl infizierter Zellen wurden bestimmt. **B** zeigt die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Zellen.

#### 4.5.2 HoxB7 ist ein positiver Regulator der viralen Replikation

Nachdem geeignete Zelllinien mit reduzierter HoxB7 Expression hergestellt werden konnten, sollte zunächst der Einfluss von HoxB7 auf die Produktion von Virusnachkommen getestet werden. Dafür wurden Kontroll- und *knock down* Zellen ausgesät (s. 3.5.4), nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet und durch Titration auf W162 Zellen die Zahl infektiöser Virusnachkommen ermittelt (s. 3.5.5).

Dabei zeigen sich Unterschiede in der Nachkommenvirusproduktion in den verschiedenen Zelllinien. In der Abbildung 4.22 ist eine Reduktion in allen HoxB7-depletierten Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzellen sichtbar. Die Stärke dieser Reduktion variiert jedoch abhängig von Zelllinie und Virus. So kann in der shHox9 Zelllinie für alle Viren lediglich eine geringe Reduktion der Zahl an Nachkommenviren verglichen mit der Kontrolle beobachtet werden. In den zwei anderen shHox Zelllinien ist die Zahl an Virusnachkommen des Wildtypvirus um mehr als die Hälfte reduziert, die Abnahme der Nachkommenvirusproduktion für die E1B-55K- bzw. E4orf6-negativen Viren ist in diesen Zellen verglichen mit der Kontrolle dagegen mehr als 10-fach. Diese Ergebnisse zeigen, dass HoxB7 einen positiven Faktor für die Virusinfektion darstellt. Weiterhin wird dieser Effekt durch E1B-55K und E4orf6 verstärkt, was die Reduktion der Nachkommenvirusproduktion bei Abwesenheit eines der beiden Proteine zeigt.

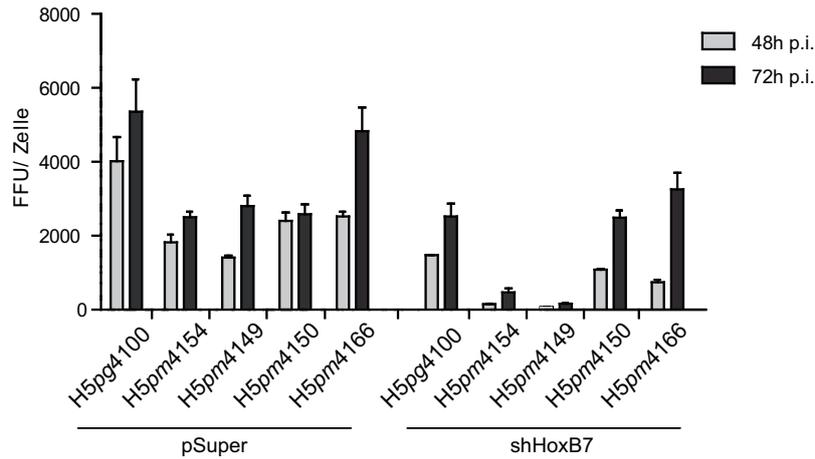


**Abbildung 4.22: Analyse der Produktion von Nachkommenviren in HoxB7-negativen Zellen.** Kontrollzellen (pSuper) sowie verschiedene HoxB7-depletierte Zelllinien wurden mit H5pg4100 sowie den Virusmutanten H5pm4149 und H5pm4154 infiziert (moi 10), zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und Nachkommenviren isoliert. Die Titration erfolgte auf W162 Zellen.

Um nun zu untersuchen, ob es sich tatsächlich um einen E1B-55K- und E4orf6-abhängigen Mechanismus handelt, wurde der Versuch mit zusätzlichen Virusmutanten wiederholt. Erneut wurden die Zellen, wie oben beschrieben, infiziert und die Zahl der isolierten Nachkommenviren durch Titration ermittelt. Jedoch wurde in diesem Experiment neben dem Wildtypvirus und den E1B-55K- und E4orf6-negativen Viren auch Virusmutanten ohne E4orf3 bzw. E4orf4 verwendet. Da im vorherigen Experiment die Klone 2 und 3 denselben Phänotyp liefern, es sich daher also nicht um einen Zelltyp-abhängigen Effekt handelt, wurde in den weiteren Versuchen nur eine shHoxB7-negative Zelllinie verwendet.

Wie der Abbildung 4.23 zu entnehmen ist, zeigt sich erneut eine etwa zweifache Reduktion der Nachkommenvirusproduktion in der Kontrollzelllinie für die E1B-55K- und E4orf6-negativen Viren verglichen mit dem Wildtypvirus. Ähnliches trifft für die E4orf3- und E4orf4-negativen Viren (H5pm4150 bzw. H5pm4166) in diesen Zellen zu. In den shHox Zellen dagegen weisen die Viren H5pm4150 und H5pm4166 genau wie das Wildtypvirus eine etwa zweifache Reduktion der Herstellung infektiöser Viruspartikel auf, während bei den H5pm4149 und H5pm4154 Viren die Synthese von Virusnachkommen erneut etwa 10-fach reduziert ist.

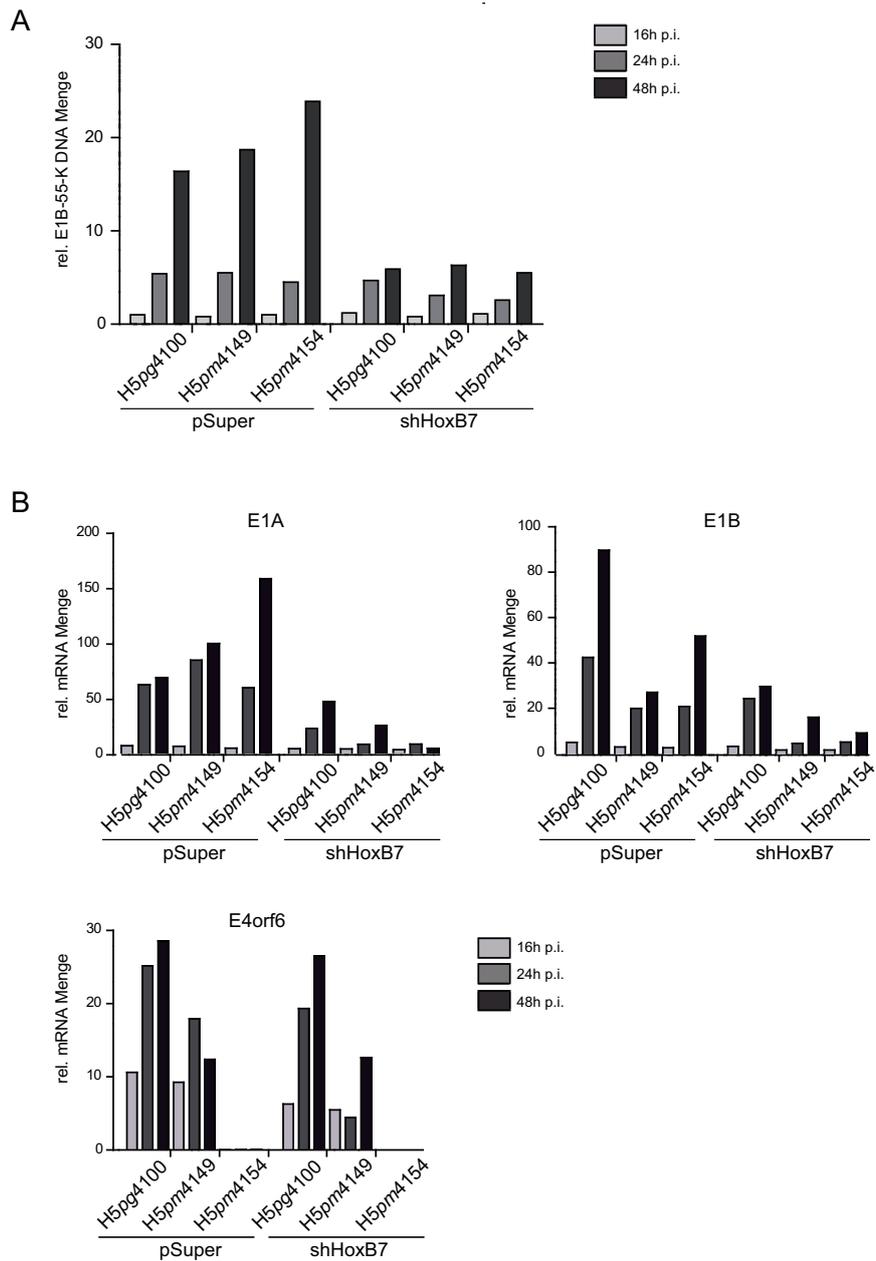
Diese Ergebnisse zeigen, dass die starke Reduktion der Nachkommenvirusproduktion in infizierten shHoxB7 Zellen ein E4orf6- und E1B-55K-abhängiger Effekt ist. Weiterhin konnte konsistent zu den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Fehlen von HoxB7 die Nachkommenvirusproduktion negativ beeinflusst und das Protein daher ein positiver Faktor der Infektion ist.



**Abbildung 4.23: Analyse der Produktion von Nachkommenviren in HoxB7-negativen Zellen.** Kontrollzellen (pSuper) sowie HoxB7 depletierte Zellen (shHox2) wurden mit H5pg4100 sowie den Virusmutanten H5pm4149, H5pm4166, H5pm4150 und H5pm4154 infiziert (moi 10), zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und Nachkommenviren isoliert. Die Titration erfolgte auf W162 Zellen.

Um nun zu identifizieren, wie HoxB7 den adenoviralen Lebenszyklus beeinflusst, wurde zunächst die virale DNA-Synthese in shHoxB7- und Kontrollzellen untersucht. Hierfür wurden die Zellen infiziert (s. 3.5.4), geerntet (s. 3.3.5) und Gesamtzelllysate hergestellt (s. 3.8.3). Jeweils gleiche Mengen wurden in eine PCR mit den E1B-55K spezifischen Oligonukleotiden Nr. 64 und 110 eingesetzt, die amplifizierten Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe des G-Box Systems und der *Gene tools* Software (Syngene) densitometrisch ausgewertet (s. 3.6.7.4). Sowohl für das Wildtypvirus als auch die E4orf6- und E1B-55K-negativen Viren zeigt sich eine Reduktion der DNA-Syntheserate in shHox Zellen verglichen mit den Kontrollzellen (Abb. 4.24 A). Die relative DNA-Synthese ist in diesen Zellen beim Wildtypvirus um die Hälfte reduziert, während sie für das H5pm4154 Virus bis zu dreifach vermindert ist. Die Reduktion der DNA-Synthese in Zellen, die mit dem E1B-55K-negativen Virus infiziert wurden, ist weniger stark, sie liegt zwischen der der beiden anderen Viren H5pg4100 und H5pm4154.

Neben der Effizienz der DNA-Syntheserate in den HoxB7-negativen Zellen wurde auch die Synthese der frühen viralen mRNAs E1A, E1B und E4orf6 überprüft. Hierfür wurden die Zellen (shHoxB7 und pSuper) mit dem Wildtypvirus H5pg4100 und den Virusmutanten H5pm4149 und H5pm4154 infiziert (s. 3.5.4), nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet und RNA isoliert (s. 3.7.2). Mit jeweils gleichen Mengen RNA wurde durch Reverse Transkription cDNA hergestellt und diese mittels quantitativer *Real Time* PCR analysiert (s. 3.7.4). Wie die Abbildung 4.24 B zeigt, sind die Mengen aller untersuchten frühen viralen mRNAs in HoxB7 depletierten Zellen gegenüber den Kontrollen reduziert. Während die Menge der E1A und der E1B mRNAs bei der Infektion mit dem Wildtypvirus in diesen Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzellen allerdings eine zwei- bis dreifache Abnahme aufweist, ist für die E4orf6 mRNA



**Abbildung 4.24: Analyse der DNA- und mRNA-Synthese in shHoxB7 Zellen.** Kontrollzellen (pSuper), sowie HoxB7 depletierte Zellen (shHox2) wurden mit H5pg4100 sowie den Virusmutanten H5pm4149 und H5pm4154 infiziert (moi 10) und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. **A** In einer PCR mit E1B-55K-spezifischen Oligonukleotiden konnte ein 389 Bp langes Fragment amplifiziert und anschließend auf einem Agarosegel sichtbar gemacht werden. Die Bandenintensitäten wurden densitometrisch ausgewertet. **B** Es wurde Gesamt-RNA isoliert und nach Reverser Transkription mittels quantitativer *Real Time* PCR die Mengen der jeweiligen mRNAs ermittelt.

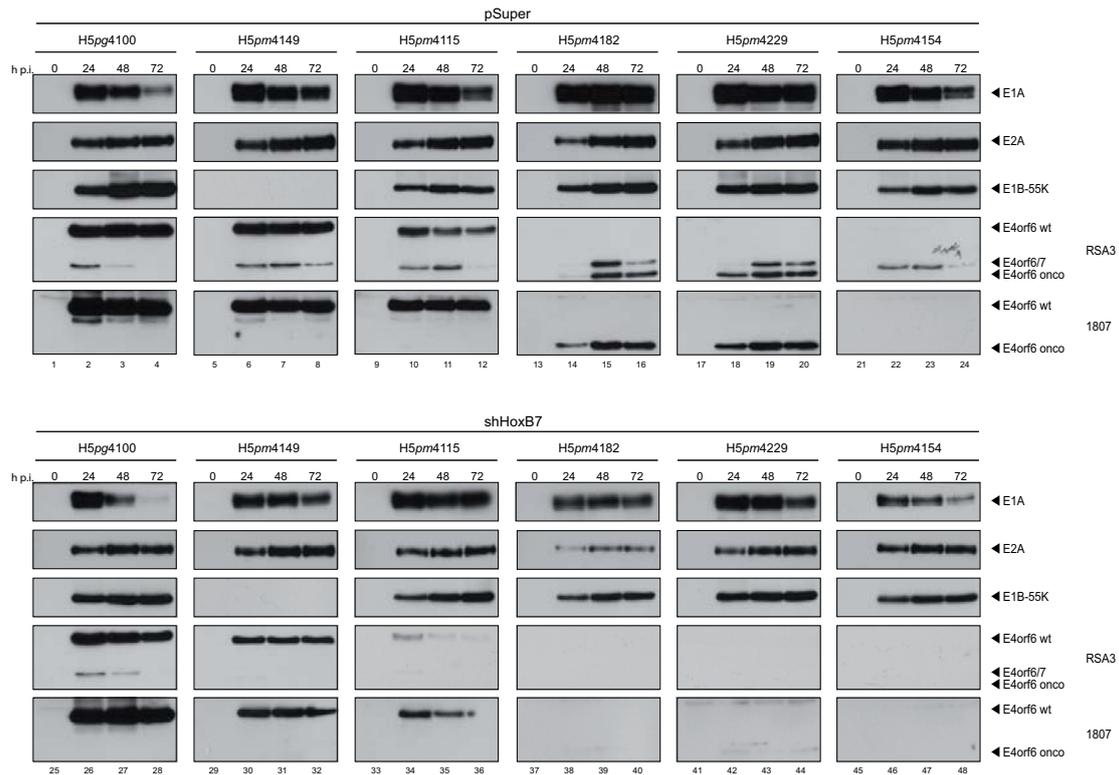
im Wildtyp lediglich ein geringer Verlust zu sehen. Interessanterweise ist die E1A mRNA Menge in Zellen, die mit dem E4orf6- oder E1B-55K-negativen Virus infiziert wurden, höher als in Wildtypvirus-infizierten Zellen. Die beiden Proteine könnten demnach einen negativen Einfluss auf die Transkription oder Stabilität der E1A mRNAs haben. Beide viralen Prote-

ine sind am Export der späten viralen mRNAs ins Zytoplasma beteiligt (Babiss *et al.*, 1985; Halbert *et al.*, 1985; Pilder *et al.*, 1986; Cutt *et al.*, 1987; Huang und Hearing, 1989; Bridge und Ketner, 1990), aber ein Einfluss auf frühe virale mRNAs ist nicht bekannt. Auffällig ist, dass in beiden Virusmutanten die Zahl der E1B-55K und E4orf6 Transkripte gegenüber dem Wildtyp reduziert ist. Dabei ist im E4orf6-negativen Virus keine E4orf6 mRNA nachweisbar. Bei der Herstellung der Virusmutanten wurde der für das E1B-55K bzw. das E4orf6 Protein kodierende DNA-Abschnitt so verändert, dass im jeweiligen N-Terminus ein (oder mehrere) Aminosäureaustausch(e) eingeführt wurde(n), die die betreffenden Aminosäuren zu Stopkodons verändern. Diese Mutationen führen zum Verlust der Proteinexpression, sollten jedoch die jeweiligen mRNAs nicht beeinträchtigen. Der Grund für die Reduktion der viralen mRNAs beruht möglicherweise auf einem als *nonsense-mediated mRNA decay* bezeichneten Prozess. Bei diesem biologischen Mechanismus werden Intron-haltige Vorläufer mRNAs, die durch Mutationen oder durch Fehler bei der Transkription vorzeitige Stopkodons enthalten, abgebaut (Frischmeyer und Dietz, 1999; Byers, 2002).

Die Ergebnisse zeigen, dass HoxB7 bereits sehr früh in den viralen Lebenszyklus einzugreifen scheint und Einfluss auf die virale DNA- sowie mRNA-Synthese nimmt. Ob dabei ein direkter Einfluss auf die DNA- und mRNA Synthese vorliegt, kann anhand dieser Versuche jedoch nicht geklärt werden.

Um die Rolle von HoxB7 während der Infektion genauer zu untersuchen, wurden zunächst auf Proteinebene weitere frühe virale Genprodukte untersucht. Nach Infektion (s. 3.5.4) und Zellernte (s. 3.3.5) wurden Gesamtzellextrakte (s. 3.8.3) hergestellt und diese auf SDS-Gelen aufgetrennt (s. 3.8.5). Anschließend wurden die Proteine auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen die verschiedenen frühen viralen Proteine detektiert (s. 3.8.6). Konsistent mit den Ergebnissen der mRNA Mengen, sind die Mengen aller untersuchten frühen viralen Proteine in den shHox Zellen verglichen mit den Kontrollzellen reduziert (Abb. 4.25). Für die Proteine E1A, E2A und E1B-55K zeigt sich dabei eine leichte Reduktion der Expression bei allen untersuchten Viren. Das E4orf6 Protein dagegen weist eine deutliche Abnahme der Expression auf. Besonders in den E4orf6 Virusmutanten (H5pm4115, H5pm4182, H5pm4229), die eine geringere Expression des E4orf6 Proteins aufweisen, ist dieser Effekt deutlich zu sehen. Hier ist eine Detektion des Proteins kaum noch möglich (Abb. 4.25; Spuren 34-36, 38-40, 42-44). Diese Reduktion der E4orf6 Proteinmenge kann mit der zuvor beobachteten Reduktion der mRNA begründet werden, jedoch ist dies wegen der starken Reduktion vermutlich nicht der einzige Grund. Es ist auch denkbar, dass die hier vorhandene starke Abnahme der Proteinmenge zum Teil durch verminderte Stabilität von E4orf6 als Folge des Fehlens von HoxB7 hervorgerufen wird.

Neben den E4orf6 Proteinen zeigt sich auch eine deutliche Abnahme der Expression von E4orf6/7 in den HoxB7-depletierten Zellen. Dieses frühe virale Protein, das bereits in der Kontrollzelllinie eine sehr schwache Expression zeigt, ist nun nicht mehr detektierbar. Ob auch hier eine Stabilisierung durch HoxB7 vorliegt, ist unklar. In dieser Arbeit wurde bereits vorher eine Interaktion zwischen HoxB7 und E4orf6/7 beobachtet (Abb. 4.18).



**Abbildung 4.25: Analyse zur Produktion früher viraler Proteine in shHoxB7 Zellen.** Kontrollzellen (pSuper) und shHoxB7 Zellen (shHox2) wurden mit H5pg4100 sowie den Virusmutanten H5pm4149, H5pm4115, H5pm4182, H5pm4229 und H5pm4154 infiziert (moi 25), zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und Gesamtzellextrakte hergestellt (0 bedeutet nicht-infiziert). Zur Überprüfung der Proteinexpression wurden diese (40  $\mu$ g E1A, 5  $\mu$ g E2A, 40  $\mu$ g E1B-55K, 40  $\mu$ g E4orf6) auf 10%igen bzw. 12%igen (bei E4orf6) SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Antikörpern gegen E1A (M73), E2A (B6-8), E1B-55K (2A6) und E4orf6 (1807 und RSA3) mit den jeweiligen HRPO-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert.

Bei der Analyse der Proteinexpression fällt erneut eine Verstärkung der E1A Expression in den Virusmutanten verglichen mit dem Wildtypvirus auf. Diese ist konsistent mit dem Anstieg der mRNA Menge der E1B-55K- und E4orf6-negativen Viren (vgl. Abb. 4.24 B).

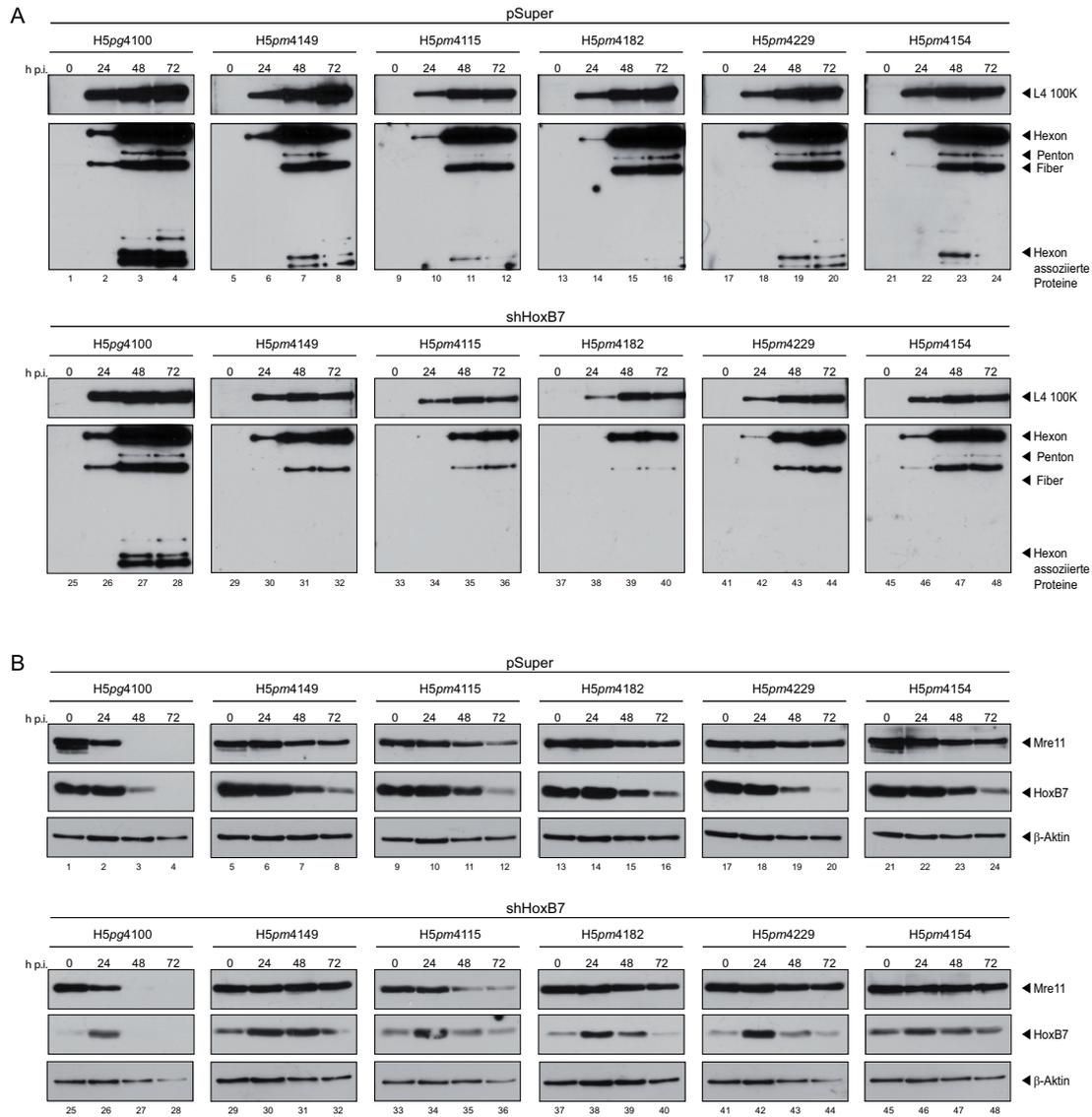
In den vorherigen Versuchen konnte eine sehr starke Reduktion der Virusnachkommenproduktion in mit E1B-55K- und E4orf6-negativen Viren infizierten shHox Zellen beobachtet werden (Abb. 4.22, Abb. 4.23). Es wurde daher angenommen, dass sowohl E1B-55K als auch E4orf6 in Abhängigkeit von HoxB7 einen Einfluss auf die sehr starke Reduktion der Nachkommenvirusproduktion haben. Da jedoch in dem E1B-55K-negativen Virus in der shHox Zelllinie, wie die Abbildung 4.25 (Spuren 30-32) zeigt, die Expression von E4orf6 deutlich reduziert ist, ist der beobachtete starke Defekt möglicherweise ausschließlich E4orf6-abhängig.

Neben der Expression früher viraler Proteine wurde auch die Expression der späten viralen Strukturproteine sowie des späten regulatorischen Proteins L4-100K analysiert. Wie bereits bei den frühen viralen Proteinen ist auch hier die Expression in shHox Zellen deutlich reduziert

(Abb. 4.26). Diese verminderte Expression der späten viralen Proteine ist höchstwahrscheinlich eine direkte Folge der ebenfalls geringeren Menge früher viraler Proteine in diesen Zellen. Erneut ist diese verminderte Synthese viraler Genprodukte in Wildtypvirus-infizierten Zellen nicht so stark ausgeprägt wie in Zellen, die mit den unterschiedlichen Virusmutanten infiziert wurden. Bei letzteren können die Penton sowie die Hexon-assoziierten Proteine im Gegensatz zum Wildtyp nicht mehr nachgewiesen werden.

Der proteasomale Abbau einer Reihe zellulärer Proteine ist für eine produktive virale Replikation nötig. Um einen Einfluss von HoxB7 auf die effiziente Destabilisierung dieser Substrate zu untersuchen, wurde der Expressionsspiegel von Mre11 im Verlauf der Virusinfektion betrachtet. Es zeigt sich beim Wildtypvirus sowohl in shHoxB7 als auch in Kontrollzellen eine Reduktion der Mre11 Expression ab 24 h nach der Infektion (Abb. 4.26 B; Spuren 2, 26) und das vollständige Fehlen der Expression bei den 48 h und 72 h Zeitpunkten (Abb. 4.26 B; Spuren 3, 4 und 27, 28). Dieses Ergebnis weist auf eine Funktionalität der mit den viralen Proteinen E1B-55K und E4orf6 assemblierten E3-Ubiquitin-Ligase auch in Abwesenheit von HoxB7 hin. Damit sind die Defekte der Virusnachkommenproduktion im Wildtypvirus folglich vermutlich nicht mit fehlendem Abbau zellulärer Substrate zu begründen. Dagegen sind bei allen Virusmutanten die Expressionsspiegel von Mre11 zu allen Zeitpunkten sowohl in den pSuper als auch den shHox Zellen vergleichbar, es erfolgt also kein proteasomaler Abbau dieses Proteins. Bereits vorher (s. 4.1.2.2) konnte festgestellt werden, dass die untersuchten E4orf6 Virusmutanten nicht in der Lage sind, die zellulären Substrate des Ligasekomplexes abzubauen.

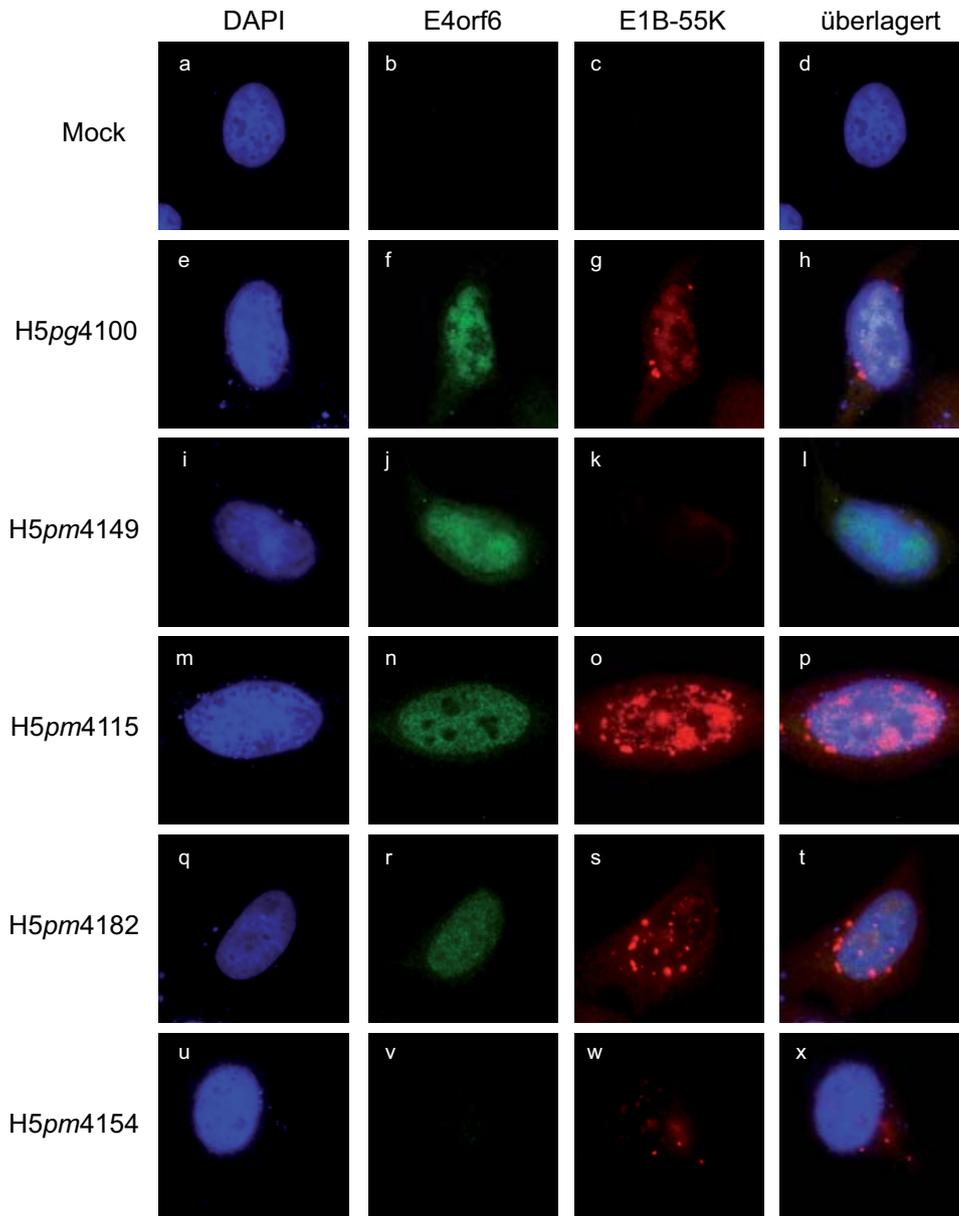
Als weiteres zelluläres Protein wurde zusätzlich HoxB7 detektiert. Es zeigt sich erneut, dass in nicht infizierten Zellen die Menge an HoxB7 in der *knock down* Zelllinie verglichen mit der Kontrolle sehr stark reduziert ist (Abb. 4.26 B; Spuren 25 bzw. 1). Interessanterweise gibt es in diesen Zellen jedoch eine Zunahme der Expression bei 24 h (Abb. 4.26 B; Spuren 26, 30, 34, 38, 42, 46), gefolgt von einer erneuten Reduktion des Proteins ab 48 h (Abb. 4.26 B; Spuren 27-28, 31-32, 35-36 usw.). Diese Reduktion der Proteinmenge ist in mit dem Wildtyp infizierten *knock down* Zellen besonders ausgeprägt. Ebenso kann in den pSuper Zellen eine Abnahme der HoxB7 Menge beobachtet werden, während hier keine Zunahme zu frühen Zeitpunkten auszumachen ist. Eine mögliche Erklärung für die steigende Expression in den *knock down* Zellen ist die Induktion von HoxB7 durch die Virusinfektion, welche aber zu gering ist, um in den Kontrollzellen sichtbar zu sein. Lediglich in den shHox Zellen mit von vornherein geringer Expression dieses Proteins kann der Anstieg nachgewiesen werden. Eine naheliegende Erklärung für die Reduktion des HoxB7 Expressionsspiegels ist der proteasomale Abbau des Proteins, welche durch die beobachtete Reduktion im Wildtypvirus gestützt wird. Dagegen spricht jedoch die vorhandene Reduktion des Proteins in den Virusmutanten, die wie vorher gezeigt wurde, Mre11 nicht abbauen können. Es könnte sich demnach um einen transkriptionellen Effekt oder um *host shut-off* handeln. Letzteres bezeichnet das, durch den reduzierten Export zellulärer mRNAs vom Nukleus ins Zytoplasma verursachte, weitgehende Fehlen der zellulären Proteinsynthese zu späten Zeitpunkten der Infektion (Dobner und Kzhyshkowska, 2001; Flint und Gonzalez, 2003). Sowohl die verstärkte als auch die reduzierte Expression von HoxB7 wird im Folgenden (s. 4.6) genauer untersucht.



**Abbildung 4.26: Analyse zur Produktion später viraler und zellulärer Proteine in sh-HoxB7 Zellen.** Kontrollzellen (pSuper) und shHoxB7 Zellen (shHox2) wurden mit H5pg4100 sowie den Virusmutanten H5pm4149, H5pm4115, H5pm4182, H5pm4229 und H5pm4154 infiziert (moi 25), zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und Gesamtzellextrakte hergestellt (0 bedeutet nicht-infiziert). Zur Überprüfung der Proteinexpression von **A** späten viralen und **B** zellulären Proteinen wurden diese Gesamtzellextrakte (20  $\mu$ g L4-100K, 3  $\mu$ g *late*, 20  $\mu$ g  $\beta$ -Aktin, 40  $\mu$ g Mre11, 150  $\mu$ g HoxB7) auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Antikörpern gegen **A** L4-100K (6B10) und dem Kapsid-Antikörper gegen mehrere späte Strukturproteine sowie **B** gegen  $\beta$ -Aktin, Mre11 und HoxB7 und mit den jeweiligen HRPO-gekoppelten Sekundäntikörpern detektiert.

Hier sollte zunächst der Einfluss von HoxB7 bzw. sein Fehlen auf die subzelluläre Lokalisation der frühen viralen Proteine E4orf6 und E1B-55K überprüft werden. Hierfür wurden die HoxB7-depletierten Zellen mit dem Wildtypvirus und den Virusmutanten H5pm4149, H5pm4115, H5pm4182 und H5pm4154 infiziert (s. 3.5.4) und die Zellen nach 24 h mit Methanol fixiert (s. 3.9.1). Der immunologische Nachweis der viralen Proteine mit spezifischen

Primärantikörpern und den jeweiligen fluoreszierenden Sekundärantikörpern erfolgte wie unter 3.9.2 beschrieben. Wie die Abbildung 4.27 zeigt, ist die subzelluläre Lokalisation von E4orf6 in den untersuchten Viren diffus im Nukleus (Bilder f, j, n, r), wie bereits in der Literatur beschrieben ist (Ornelles und Shenk, 1991; Goodrum *et al.*, 1996) und vorher in dieser Arbeit beobachtet werden konnte (s. 4.1.2.3). Das Fehlen von HoxB7 hat demnach keinen Einfluss auf die Lokalisation von E4orf6.



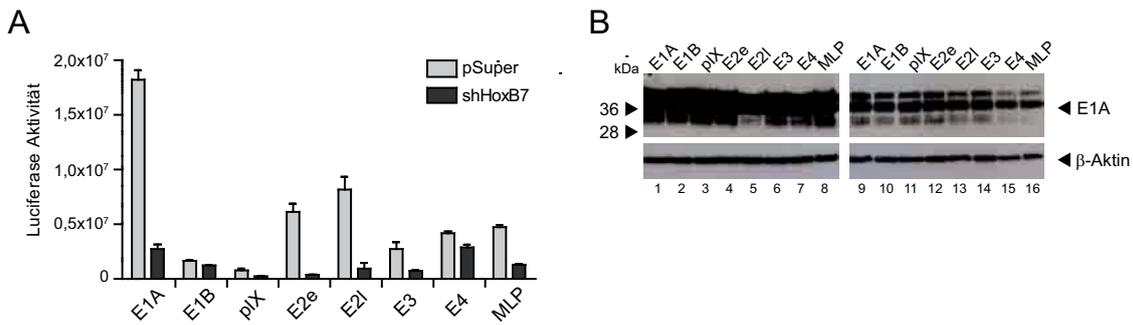
**Abbildung 4.27: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der subzellulären Lokalisation viraler Proteine in Abwesenheit von HoxB7.** shHox2 Zellen wurden mit H5pg4100 sowie den Virusmutanten H5pm4149, H5pm4115, H5pm4182 und H5pm4154 infiziert (moi 25), nach 24 h mit Methanol fixiert und mit Antikörpern gegen E4orf6 (1807) und E1B-55K (2A6) sowie den entsprechenden Sekundärantikörpern detektiert. Die Zellkerne sind mit DAPI sichtbar gemacht worden.

In Wildtypvirus-infizierten Zellen lokalisiert E1B-55K teilweise diffus im Zytoplasma und in perinukleären Aggregaten, größtenteils ist es jedoch im Nukleus detektierbar (Abb. 4.27 g). In Viren, denen ein funktionelles E4orf6 fehlt, ist E1B-55K dagegen kaum im Nukleus sondern überwiegend im Zytoplasma und in Zellkern-nahen Aggregaten zu finden (Abb. 4.27 o, s, w). Damit entspricht auch die subzelluläre Lokalisation von E1B-55K der in der Literatur beschriebenen (Ornelles und Shenk, 1991; Smiley *et al.*, 1990) bzw. der bereits vorher beobachteten (s. 4.1.2.3). Ein Einfluss von HoxB7 auf die subzelluläre Lokalisation dieser beiden viralen Proteine kann damit ausgeschlossen werden.

### 4.5.3 HoxB7 beeinflusst die Transkription von viralen Promotoren

Nachdem mit vorherigen Experimenten gezeigt werden konnte, dass HoxB7 in die frühe Phase der Virusinfektion eingreift, sollte seine Rolle nun weiter spezifiziert werden. Das zelluläre Protein gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren (McGinnis und Krumlauf, 1992), die die Expression zahlreicher Gene beeinflussen (Pearson *et al.*, 2005). Daher sollte ein möglicher Einfluss des Proteins auf die Transkription von viralen Promotoren in Reporter-genversuchen untersucht werden. Hierfür wurden pGL3-Basic Plasmide, die die *Firefly*-Luciferase unter der Kontrolle der verschiedenen viralen Promotoren exprimieren, in die shHox und pSuper Zellen eingebracht (s. 3.3.4.1) und nach Lyse der Zellen die Luciferase Expression mit dem Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega) bestimmt (s. 3.10). Anhand der Umsetzung des Substrates der Luciferase zu einem lumineszierenden Produkt, konnten Rückschlüsse auf die Stärke der Luciferaseexpression und damit auf die Promotoraktivität gezogen werden. Zur Normalisierung der Messwerte diente die *Renilla*-Luciferase.

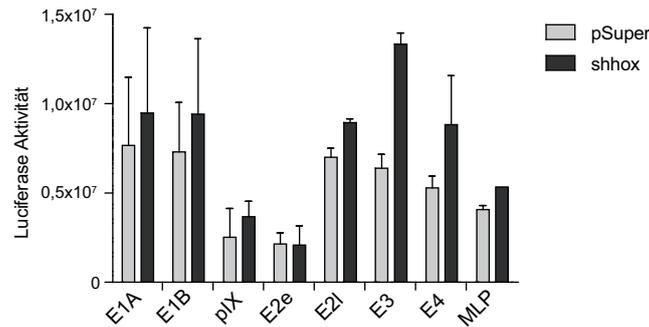
Während der Infektion haben verschiedene virale Genprodukte Einfluss auf die Aktivität der unterschiedlichen Promotoren. E1A wird als erstes virales Genprodukt exprimiert und wirkt als Transaktivator, der die Expression der anderen viralen Transkriptionseinheiten induziert (Jones und Shenk, 1979; Shenk *et al.*, 1980). In diesem Versuch wurde daher E1A transient transfiziert, um die sehr frühe Phase der Infektion zu simulieren. Wie in der Abbildung 4.28 A zu sehen ist, ist die Luciferaseaktivität für alle viralen Promotoren in der HoxB7-depletierten Zelllinie geringer als in den Kontrollzellen. Besonders groß ist die Reduktion der Aktivität bei den Promotoren E1A (siebenfach), E2e (16-fach) und E2l (neunfach). Für den pIX-, E3- und MLP-Promotor zeigen sich geringere Veränderungen (dreifach für pIX bzw. vierfach für E3 und MLP). Lediglich geringfügig reduziert ist die Aktivität der Promotoren E1B (1,3-fach) und E4 (1,4-fach), was möglicherweise teilweise an geringeren Mengen des E1A Proteins in den shHox Zellen (Abb. 4.28 B) liegt. HoxB7 beeinflusst demnach die Transkription fast aller viralen Promotoren, die Modulation der Aktivität der Promotoren E1A und E2 ist dabei besonders auffällig und selbst unter Einbeziehung der reduzierten E1A Proteinmengen noch signifikant.



**Abbildung 4.28: Untersuchung des Einflusses von HoxB7 auf die Aktivität viraler Promotoren.** **A** pSuper und shHox2 Zellen wurden mit Plasmiden, die das E1A Protein sowie die *Firefly*-Luciferase unter Kontrolle der viralen Promotoren E1A, E1B, pIX, *E2early* (E2e), *E2late* (E2l), E3, E4 und MLP exprimieren, mittels PEI-Methode transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Luciferase mit den unterschiedlichen Konstrukten bestimmt. Die Werte wurden mit der *Renilla*-Luciferase, die als Kontrolle kotransfiziert wurde, normiert. **B** Die Lysate wurden auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Antikörpern gegen E1A (610) und  $\beta$ -Aktin und mit den jeweiligen HRPO-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert.

Da bei diesem Reporterexperiment lediglich E1A transfiziert wurde, wurde eine mögliche HoxB7 induzierte Transkriptions-Aktivierung der viralen Promotoren in einem Reporterexperiment in der Infektion untersucht. Hierfür wurden shHox und Kontrollzellen mit dem Wildtypvirus infiziert und anschließend mit pGL3-Basic Plasmiden, die die *Firefly*-Luciferase unter der Kontrolle der verschiedenen viralen Promotoren exprimieren, transfiziert. Nach 48 h wurde die Promotoraktivität, wie unter 3.10 beschrieben, bestimmt. Aus der Abbildung 4.29 ist ersichtlich, dass für fast alle untersuchten Promotoren die Aktivität in den HoxB7-depletierten Zellen zumindest geringfügig höher ist als in den Kontrollzellen. Die Promotoraktivität für E1A ist 1,2-fach verstärkt, für E1B, E2l und MLP 1,3-fach. Die stärksten Erhöhungen sind beim E3-Promotor (ca. zweifach) und E4-Promotor (1,7-fach) zu sehen. Die Aktivität des E2e-Promotors ist unverändert.

Scheinbar hat HoxB7 in der späten Phase der Infektion einen eher negativen Effekt auf die Aktivität der viralen Promotoren. Zu diesem Zeitpunkt sind neben E1A weitere frühe virale Genprodukte exprimiert und beeinflussen möglicherweise die Transaktivatorwirkung von HoxB7. Neben E1A gibt es weitere virale Proteine, die die Transkription regulieren. So kann auch das Protein E2A die Transkriptionsrate der viralen Promotoren E1A, E2 und MLP verstärken (Chang und Shenk, 1990). Der *E2early*-Promotor kann darüber hinaus noch von einem weiteren viralen Genprodukt reguliert werden. Das E4orf6/7 Protein kann die Fähigkeit des Transkriptionsfaktors E2F an DNA zu binden verstärken und ermöglicht so eine effizientere Aktivierung des viralen *E2early*-Promotors (Bandara *et al.*, 1994; Huang und Hearing, 1989). Das Zusammenspiel dieser unterschiedlichen Faktoren in einer Infektion könnte die Unterschiede der Ergebnisse der Reporterexperimente in der Transfektion und der Infektion erklären.



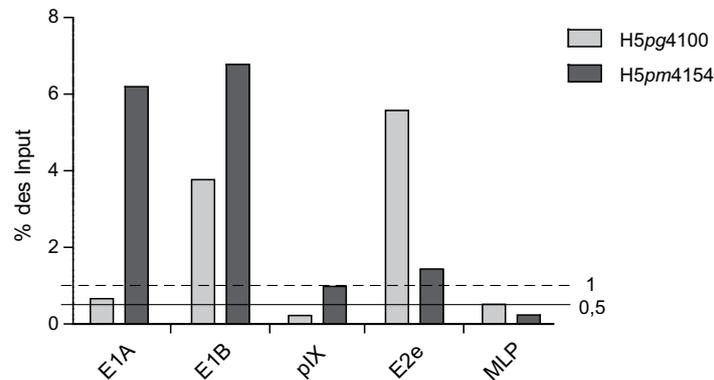
**Abbildung 4.29: Untersuchung des Einflusses von HoxB7 auf die Aktivität viraler Promotoren während der Infektion.** pSuper und shHox2 Zellen wurden mit dem Wildtypvirus infiziert (moi 10) und anschließend mit Plasmiden, die das E1A Protein sowie die *Firefly*-Luciferase unter Kontrolle der viralen Promotoren E1A, E1B, pIX, E2<sub>early</sub> (E2e), E2<sub>late</sub> (E2l), E3, E4 und MLP exprimieren, mittels PEI-Methode transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Luciferase mit den unterschiedlichen Konstrukten bestimmt. Die Werte wurden mit der *Renilla*-Luciferase, die als Kontrolle kotransfiziert wurde, normiert.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass HoxB7 die Transkription der frühen viralen Promotoren E1A und E2 bei alleiniger Anwesenheit von E1A unterstützt und damit erst durch Anwesenheit dieses zellulären Proteins eine effiziente Expression früher und später viraler Proteine gegeben ist. Dies ist die Voraussetzung für eine maximale Produktion an infektiösen Nachkommenviren. Dagegen hat das zelluläre Protein zu späteren Zeitpunkten in der Infektion möglicherweise einen negativen Einfluss auf die Promotoraktivität. Wie genau die Regulation erfolgt, konnte hier nicht geklärt werden, eine mögliche Interaktion von HoxB7 mit anderen viralen Proteinen wird in 4.5.5 untersucht.

#### 4.5.4 E4orf6 reguliert die HoxB7-abhängige und -unabhängige Transkription

Um als Transkriptionsfaktor einen Einfluss auf die Expression bestimmter Gene auszuüben, muss dieser an den Promotorbereich des jeweiligen Gens binden. Für Hox Proteine konnte zwar eine DNA Sequenz ermittelt werden, diese ist aber sehr kurz und einfach und ermöglicht keine Unterscheidung der verschiedenen Hox Proteine. Diese Regulation erfolgt durch unterschiedliche Kofaktoren, die die Bindung des jeweiligen Hox Proteins beeinflussen (Chen und Sukumar, 2003a; Lawrence *et al.*, 2005; Chauvet *et al.*, 2000). Es ist daher schwierig, anhand der DNA Sequenz eine Aussage zu treffen, ob ein bestimmtes Gen durch Hox Proteine reguliert werden könnte oder nicht. Daher wurde experimentell durch Chromatin-Immunpräzipitation die Bindung von HoxB7 an die DNA der viralen Promotoren in infizierten Zellen analysiert. Hierfür wurden H1299 Zellen mit dem Wildtypvirus H5pg4100 und dem E4orf6-negativen Virus H5pm4154 infiziert (s. 3.5.4), die Zellen nach 24 h geerntet und Gesamtzelllysate (s. 3.8.3) hergestellt. Mittels Chromatin-Immunpräzipitation und anschließender quantitativer *Real Time* PCR wurde die Bindung von HoxB7 an die viralen Promotoren E1A, E1B, pIX, E2e und MLP untersucht (s. 3.8.9). Zur Ermittlung der Werte wurden Kontrollen sowie die eingesetzte Pro-

teinmenge mit einbezogen. Alle Werte über 0,5% des Inputs gelten als Bindung, wobei Werte über 1% eine gute Bindung darstellen. Wie in der Abbildung 4.30 zu sehen ist, kann HoxB7 im Wildtypvirus demnach an die Promotoren E1A, E1B, E2e und MLP binden, wobei die Interaktion beim E1A- und MLP-Promotor unter 1% des jeweiligen Inputs und damit schwach ist. Die in Reporterexperimenten gefundene Regulation der Transkription der viralen Promotoren durch HoxB7 wird hierdurch untermauert. Das Fehlen von E4orf6 beeinflusst die Bindung von HoxB7 an allen untersuchten Promotoren entweder positiv oder negativ. Beim Fehlen dieses viralen Proteins ergibt sich für den E1A-Promotor eine etwa sechsfach verstärkte, beim E1B-Promotor eine 1,8-fach verstärkte Interaktion. Während im Wildtypvirus keine Bindung von HoxB7 an den pIX-Promotor ausgemacht werden kann, ermöglicht das Fehlen von E4orf6 eine Bindung des Proteins an diesen Promotor. Die Interaktion von HoxB7 mit den Promotoren E2e und MLP ist im E4orf6-negativen Virus verglichen mit dem Wildtypvirus schwächer, beim E2-Promotor ist eine vierfache Reduktion zu sehen, während im Falle des MLP-Promotors die Bindung verloren geht.

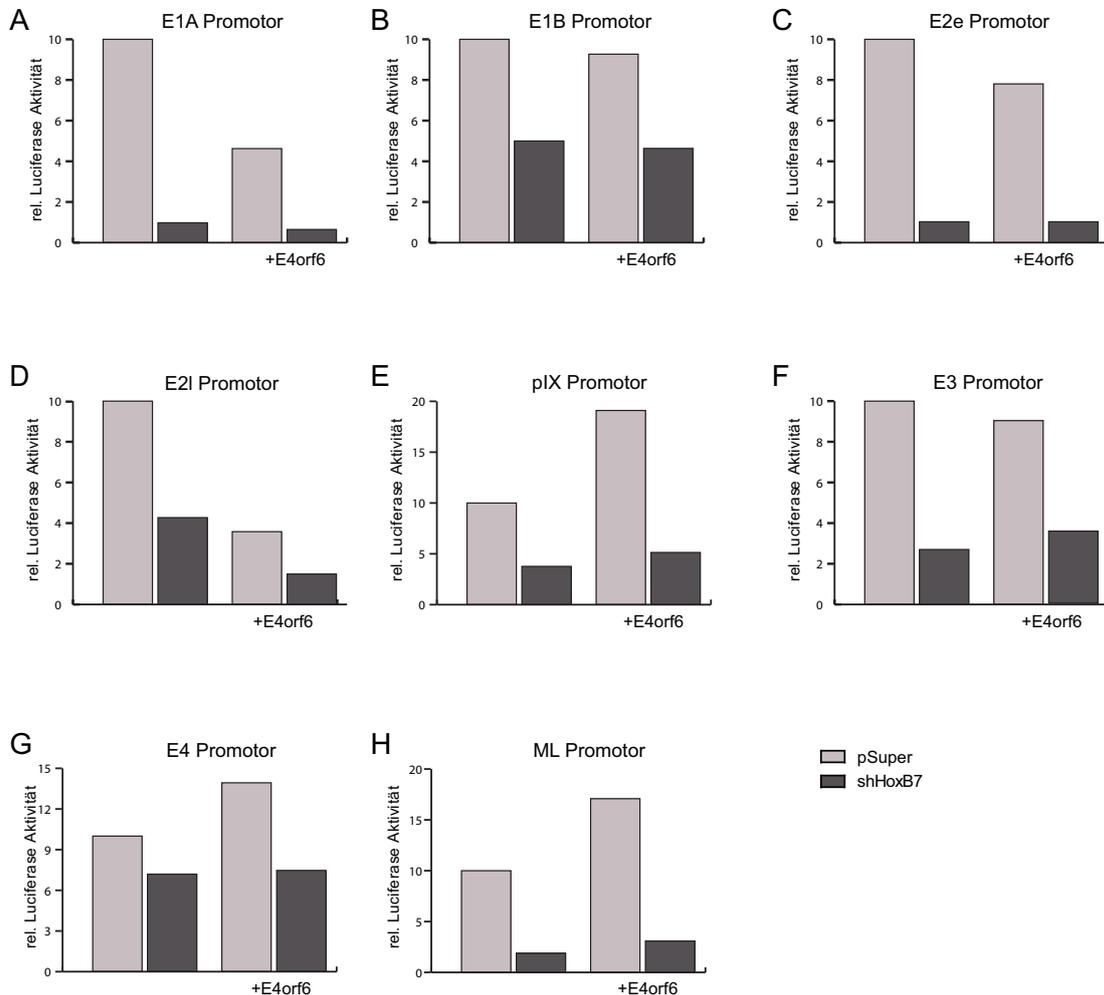


**Abbildung 4.30: Analyse der Bindung von HoxB7 an virale Promotoren.** H1299 Zellen wurden mit H5pg4100 sowie der Virusmutante H5pm4154 infiziert (moi 10), 24 h p. i. fixiert und geerntet. Es wurden Gesamtzelllysate hergestellt, von denen jeweils gleiche Mengen für eine Chromatin-Immünpräzipitation verwendet wurden. Durch quantitative *Real Time* PCR wurde die Bindung von HoxB7 an die viralen Promotoren E1A, E1B, pIX, E2*early* (E2e) und MLP analysiert.

Demnach ist das virale Protein E4orf6 in der Lage, die Bindung von HoxB7 an die unterschiedlichen viralen Promotoren zu regulieren. Dabei wirkt es auf die Interaktion mit den Promotoren E1A, E1B und pIX inhibierend, während es sie bei den Promotoren E2e und MLP fördert.

Einige Studien zeigen, dass die Bindung und damit auch die Funktion von Hox Proteinen durch ihre Interaktion mit Kofaktoren gesteuert wird (Lu *et al.*, 1995; Fernandez *et al.*, 2008). Aus diesem Grund wurde in einem erneuten Reporterexperiment der Einfluss von E4orf6 auf die transkriptionelle Aktivität von HoxB7 untersucht und mit den Ergebnissen zur Promotorbindung verglichen. Dazu wurden erneut, wie oben beschrieben, pSuper- und shHox-Zellen mit den viralen Promotoren sowie dem E1A Protein transfiziert und die Promotoraktivität

anhand der Luciferase Expression bestimmt. Um einen Einfluss von E4orf6 festzustellen, wurde darüber hinaus auch dieses Protein in den Zellen exprimiert. Aus der Abbildung 4.31 ist ersichtlich, dass E4orf6 einen Einfluss auf die Transkription einiger viraler Promotoren zu haben scheint.



**Abbildung 4.31: Untersuchung des Einflusses von E4orf6 und HoxB7 auf die Aktivität viraler Promotoren.** pSuper und shHox2 Zellen wurden mit Plasmiden, die die Proteine E1A bzw. E4orf6 sowie die *Firefly*-Luciferase unter Kontrolle der viralen Promotoren E1A (A), E1B (B), E2<sub>early</sub> (E2e, C), E2<sub>late</sub> (E2l, D), pIX (E), E3 (F), E4 (G) und MLP (H) exprimieren, mittels PEI-Methode transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Luciferase mit den unterschiedlichen Konstrukten bestimmt. Die Werte wurden mit der *Renilla*-Luciferase, die als Kontrolle kotransfiziert wurde, normiert. Diese Werte wurden für den jeweiligen Promotor in pSuper Zellen ohne E4orf6 auf 10 normiert.

So reduziert das virale Protein die Luciferase Aktivität des E1A-Promotors um etwa die Hälfte; dies kann in beiden Zelllinien beobachtet werden (Abb. 4.31 A). Die Expression von E4orf6 beeinflusst die Luciferase Aktivität ausgehend vom E2e-Promotor lediglich in den pSuper Zellen, wenn auch nur eine geringe Reduktion zu sehen ist (Abb. 4.31 C). Beim E2l-Promotor zeigt sich eine Reduktion der Aktivität um mehr als die Hälfte, sowohl in An- als auch in Abwesenheit von HoxB7 (Abb. 4.31 D). Der Einfluss des viralen Proteins auf

die Luciferase Aktivität ist beim pIX-, E4- und MLP-Promotor positiv. Die Werte des pIX-Promotors verdoppeln sich in den pSuper Zellen, während in HoxB7-depletierten Zellen der Unterschied nicht so stark ist (Abb. 4.31 E). Eine Erhöhung kann auch für den E4-Promotor beobachtet werden (1,3-fach), jedoch ausschließlich in pSuper Zellen (Abb. 4.31 G). Ebenso wird die Aktivität, ausgehend vom MLP-Promotor, 1,7-fach erhöht, dies ist neben den pSuper- auch in shHox Zellen zu sehen (Abb. 4.31 H). Für die Promotoren E1B und E3 sind nur unwesentliche Unterschiede auf transkriptioneller Ebene mit und ohne E4orf6 zu erkennen (Abb. 4.31 B, F).

Diese Daten zeigen, dass das E4orf6 Protein einen Einfluss auf die Transkription der viralen Promotoren zu haben scheint. Für den E1A-Promotor stellt das Protein einen negativen Faktor dar und auch bei der Chromatin-Immunpräzipitation konnte sein negativer Einfluss auf die Bindung von HoxB7 an diesen Promotor beobachtet werden. Diese Daten sind konsistent mit der bereits vorher beobachteten verstärkten Expression von E1A sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene bei Virusmutanten, denen ein funktionelles E4orf6 Protein fehlt. Auch die Aktivität der E2-Promotoren wird durch E4orf6 negativ beeinflusst, dagegen fördert dieses Genprodukt die Bindung von HoxB7 an den E2e-Promotor. Entgegen des positiven Einflusses von E4orf6 auf die Aktivität des pIX-Promotors hemmt das virale Protein die Bindung von HoxB7 an diesen Promotor. Ein ebenfalls positiver Einfluss auf die Promotoren E4 und MLP konnte gezeigt werden.

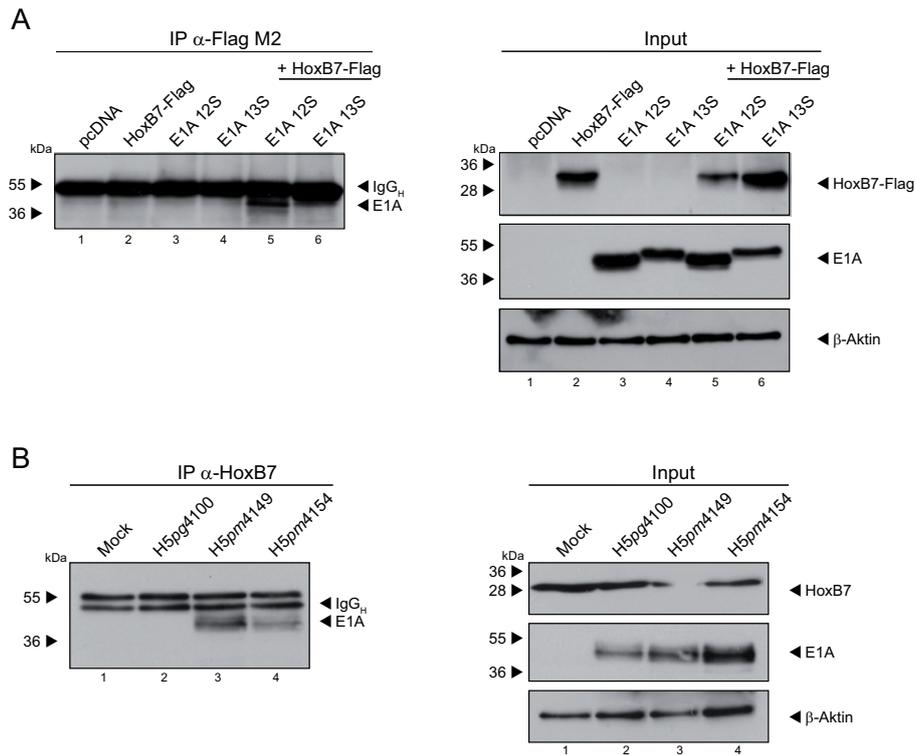
Das virale Protein kann die verschiedenen Promotoren dabei sowohl abhängig als auch unabhängig von HoxB7 regulieren. So zeigt sich eine Abhängigkeit von dem zellulären Protein für die Promotoren E2e und E4 sowie teilweise für pIX.

#### **4.5.5 Interaktion von HoxB7 mit den viralen Transkriptionsregulatoren E1A, E2A und E4orf6/7**

Nachdem in den vorherigen Versuchen mehrfach der Einfluss von HoxB7 auf die Transkription viraler Promotoren gezeigt werden konnte, wurde eine mögliche Interaktion dieses zellulären Proteins mit den bekannten viralen transkriptionsregulatorischen Faktoren untersucht. Hierfür wurden zunächst H1299 Zellen nach der PEI-Methode (s. 3.3.4.1) mit Plasmiden transfiziert, die für Flag-markiertes HoxB7 sowie E1A-12S und E1A-13S kodieren. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet (s. 3.3.5), Gesamtzelllysate hergestellt (s. 3.8.3) und die Interaktion von E1A mit HoxB7 durch Koimmunpräzipitation (s. 3.8.8.2) untersucht. Wie die Abbildung 4.32 A zeigt, kann HoxB7 sowohl mit dem 12S- als auch mit dem 13S-E1A Protein in transient transfizierten Zellen interagieren (Spuren 5, 6).

Auch unter physiologischen Bedingungen wurde die Bindung der beiden Genprodukte ermittelt. Dazu wurden die Zellen mit dem Wildtypvirus sowie E1B-55K- und E4orf6-negativen Viren infiziert, nach 24 h geerntet und erneut Gesamtzelllysate hergestellt. Die Proteine wurden mittels endogenem HoxB7-Antikörper immunpräzipitiert, durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (s. 3.8.5) und mittels *Western Blot* (s. 3.8.6) analysiert. Auch während einer Virusinfektion erfolgt die Bindung von endogenem HoxB7 an E1A, jedoch nur bei den E1B-55K- und E4orf6-negativen Viren (Abb. 4.32 B; Spuren 3, 4) und nicht im Wildtyp (Abb. 4.32 B;

Spur 2).

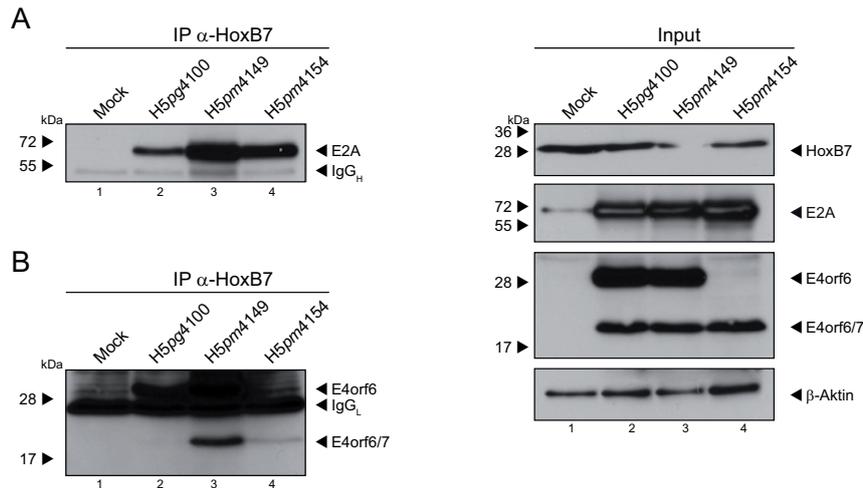


**Abbildung 4.32: Interaktion von HoxB7 mit E1A in H1299 Zellen.** Die Zellen wurden transfiziert, 48 h p.t. geerntet (**A**) bzw. mit den Viren H5pg4100, H5pm4149 und H5pm4154 infiziert (moi 50), 24 h p.i. geerntet (**B**) und Gesamtzellextrakte hergestellt. Zur Überprüfung der Expression wurden diese (60  $\mu$ g E1A, 120  $\mu$ g HoxB7-Flag und 20  $\mu$ g  $\beta$ -Aktin) mittels 12%iger SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen E1A (**A**: 610 bzw. **B**: M73), HoxB7-Flag (Flag-M2) und  $\beta$ -Aktin (AC-15) als Ladekontrolle sowie den jeweiligen HRPO-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert. Zur Koimmunpräzipitation wurde 1 mg Zellysate zuvor mit dem Flag-M2-Antikörper (**A**) bzw. 2 mg Zellysate zuvor mit dem HoxB7-Antikörper (**B**) immunpräzipitiert. Nach Auftrennung über 12%ige SDS-Gele, wurden die Proteine auf Nitrozellulose übertragen und mit einem Antikörper gegen E1A (610 bzw. M73) sowie den entsprechenden HRPO-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert.

Es ist denkbar, dass die Interaktion von HoxB7 und E1A durch andere virale Faktoren negativ beeinflusst wird. Möglicherweise erfolgt in Anwesenheit von E4orf6 bevorzugt eine Interaktion von HoxB7 mit diesem viralen Genprodukt und nicht mit E1A. Auch ein Einfluss von E1B-55K scheint vorhanden zu sein. Demnach ist eine Interaktion dieser beiden Proteine also möglich, unter welchen Bedingungen sie im Laufe einer Virusinfektion erfolgt, bleibt allerdings zu klären.

Neben E1A spielen auch die Proteine E2A und E4orf6/7 eine Rolle bei der Transkriptionsregulation der viralen Promotoren E1A, E2 und MLP. Da ein Einfluss von HoxB7 auf diese Promotoren höchstwahrscheinlich vorliegt und in Reporterassays unterschiedliche Ergebnisse mit E1A alleine oder weiteren viralen Faktoren gefunden wurden, wurde auch eine

Interaktion mit diesen viralen Proteinen untersucht. Zunächst wurden dafür H1299 Zellen infiziert (s. 3.5.4), lysiert (s. 3.8.3) und gleiche Mengen der Zellysate für eine Koimmunpräzipitation mit dem endogenen HoxB7-Antikörper eingesetzt (s. 3.8.8.2). Die Proteine wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (s. 3.8.5) und mittels *Western Blot* analysiert (s. 3.8.6). Wie der Abb. 4.33 A zu entnehmen ist, interagiert das endogene HoxB7 mit dem E2A Protein aller untersuchter Viren. Dabei ist die Interaktion in mit dem E4orf6-negativen Virus infizierten Zellen stärker als in Wildtyp infizierten Zellen (Spuren 2, 4). Auch für das E1B-55K-negative Virus ist eine verstärkte Bindung zu sehen (Spur 3).



**Abbildung 4.33: Interaktion von HoxB7 mit E2A und E4orf6/7 in infizierten H1299 Zellen.** Die Zellen wurden mit den Viren H5pg4100, H5pm4149 und H5pm4154 infiziert (moi 50), 24 h p.i. geerntet und Gesamtzellextrakte hergestellt. Zur Überprüfung der Expression wurden diese (20  $\mu$ g E2A, 50  $\mu$ g E4orf6/7, 120  $\mu$ g HoxB7 und 20  $\mu$ g  $\beta$ -Aktin) mittels 12%iger SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen E2A (B6), E4orf6/7 (RSA3), HoxB7 und  $\beta$ -Aktin (AC-15) als Ladekontrolle sowie den jeweiligen HRPO-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert. Zur Koimmunpräzipitation wurde 2 mg (**A**) bzw. 4 mg (**B**) Zellysate zuvor mit dem HoxB7-Antikörper immunpräzipitiert. Nach Auftrennung über 12%ige SDS-Gele wurden die Proteine auf Nitrozellulose übertragen und mit einem Antikörpern gegen E2A (B6-8; **A**) bzw. E4orf6/7 (RSA3; **B**) sowie den entsprechenden HRPO-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert.

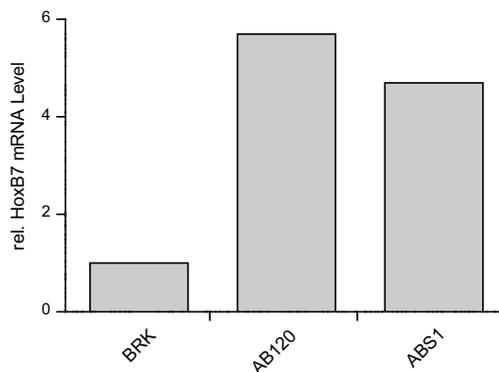
Neben dem E2A Protein kann auch E4orf6/7 in den Virusmutanten an das zelluläre Genprodukt binden (Abb. 4.33 B Spuren 3, 4). Wie bereits für E1A beobachtet werden konnte, erfolgt dagegen im Wildtypvirus keine Interaktion mit HoxB7 (Spur 2). Durch diese Daten wird damit die bereits im *GST-pull down* Experiment gefundene (vgl. 4.3.4) Interaktion von HoxB7 und E4orf6/7 bestätigt. Ob es sich bei der Binderegion im E4orf6/7 Protein um den gemeinsamen N-Terminus von E4orf6 und E4orf6/7 oder den alternativen C-Terminus des Proteins handelt, ist nicht klar.

Die verstärkte Interaktion von HoxB7 mit allen untersuchten viralen Proteinen im E1B-55K-negativen Virus spricht für eine Interaktion dieser beiden Genprodukte. Allerdings konnte weder in der Infektion noch in der transienten Transfektion die Bindung dieser beiden Proteine

nachgewiesen werden (ohne Abbildung). Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass im Verlauf der Infektion mehrere virale Proteine mit HoxB7 interagieren können.

## 4.6 Veränderte Expression von HoxB7 im Verlauf des viralen Infektionszyklus

In mehreren vorherigen Versuchen konnte eine Veränderung des HoxB7 Expressionsspiegels im Verlauf einer viralen Infektion beobachtet werden. Es zeigte sich eine verstärkte Expression bei etwa 24 h nach der Infektion, gefolgt von einer erneuten Abnahme der Proteinmenge (Abb. 4.26 B). Für p53 und andere zelluläre Proteine ist eine E1A-abhängige Induktion zu Beginn der Infektion bekannt (Blais und Dynlacht, 2004; Ferrari *et al.*, 2009). Es wurden daher Zelllinien mit und ohne E1A hinsichtlich der Expression von HoxB7 untersucht. Hierfür wurde aus primären (BRK) sowie aus stabil E1A, E1B und E4orf6 exprimierenden BRK Zellen (AB120 und ABS1) Gesamt-RNA isoliert (s. 3.7.2), cDNA hergestellt und diese mittels quantitativer *Real Time* PCR untersucht (s. 3.7.4). Es zeigte sich eine sechsfache Erhöhung der HoxB7 mRNA in Anwesenheit von E1A und E1B-55K (Abb. 4.34). Koexpression von E4orf6 in ABS1 Zellen reduziert die HoxB7 Expression leicht.

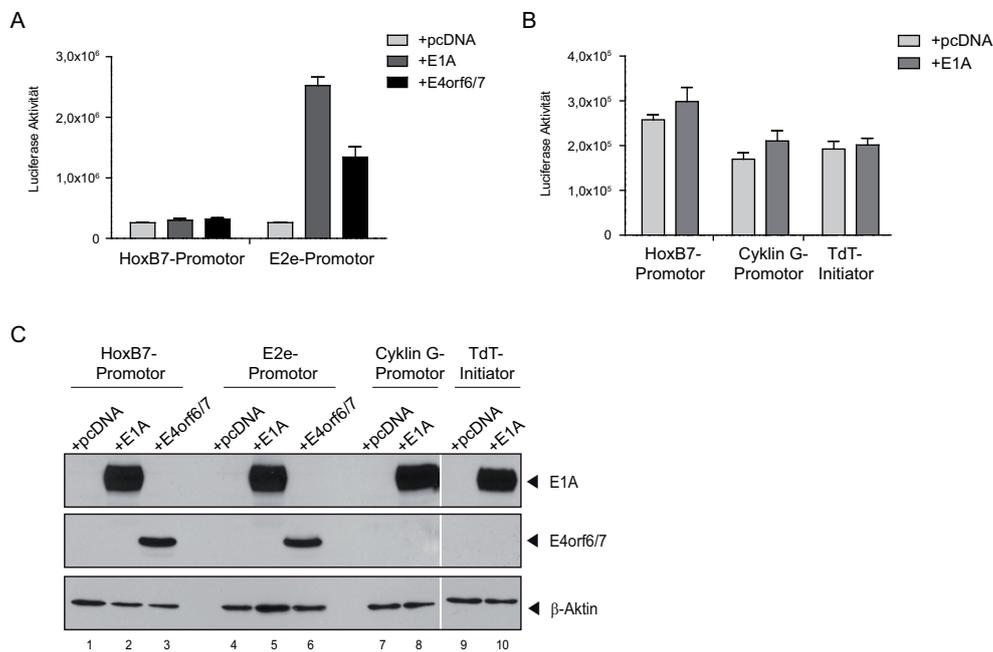


**Abbildung 4.34: Analyse zur mRNA Menge von HoxB7 in transformierten BRK Zellen.** Aus primären Rattennierenzellen (BRK), mit E1A und E1B-55K transformierten BRK (AB120) und mit E1A, E1B-55K und E4orf6 transformierten BRK (ABS1) Zellen wurde mRNA isoliert und diese mittels quantitativer *Real Time* PCR analysiert.

E1A kann die Expression viraler aber auch zellulärer Gene durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren E2F und YY1 induzieren (Jones und Shenk, 1979; Lillie und Green, 1989; Lee *et al.*, 1995). Auch E4orf6/7 zeigt transaktivierende Funktionen für den viralen E2-Promotor (Bandara *et al.*, 1994).

Die Kenntnis darüber, welche Faktoren die Expression der verschiedenen Hox Proteine regulieren, ist sehr begrenzt (Castronovo *et al.*, 1994; Boudreau *et al.*, 1997). Allerdings konnten in Studien zur Untersuchung dieser Regulation ein YY1-Erkennungsmotiv im HoxB7-Promotor identifiziert werden, welches funktional zu sein scheint (Meccia *et al.*, 2003). Darüber hinaus

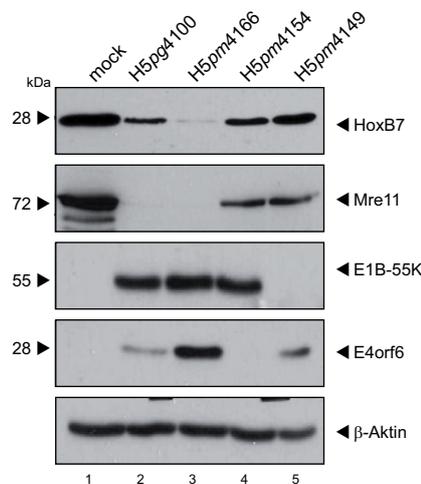
konnte gezeigt werden, dass das Homolog des Transkriptionsfaktors E2F in *Xenopus laevis* die Expression verschiedener Hox Gene, darunter auch HoxB7, induzieren kann (Suzuki und Hemmati-Brivanlou, 2000). Ein Einfluss von E1A und E4orf6/7 auf den HoxB7 Promotor ist also durchaus möglich und wurde im Folgenden untersucht. Hierfür wurde der HoxB7 Promotor aus genomischer DNA (s. 3.6.3) amplifiziert (s. 3.6.7) und vor das Luciferase Gen kloniert (s. 3.6.8). In einem Reporter-genversuch (s. 3.10) wurde eine mögliche Aktivierung des HoxB7-Promotors durch die beiden viralen Proteine E1A und E4orf6/7 untersucht. Wie die Abbildung 4.35 A zeigt, ist für HoxB7 eine sehr geringe Erhöhung der Promotoraktivität in Anwesenheit von E1A und E4orf6/7 zu sehen (1,2-fach bzw. 1,3-fach), während die Aktivität des E2*early*-Promotors durch E1A etwa zehnfach und durch E4orf6/7 etwa fünffach gesteigert wird. Auch die Aktivität anderer zellulärer vermutlich E1A-aktivierbarer Promotoren wird nur etwa 1,3-fach (Cyklin G) bzw. 1,1-fach (TdT-Initiator) gesteigert (4.35 B).



**Abbildung 4.35: Untersuchung des Einflusses von E1A und E4orf6/7 auf die HoxB7-Promotoraktivität.** **A, B** H1299 Zellen wurden mit Plasmiden, die das E1A oder E4orf6/7 Protein sowie die *Firefly*-Luciferase unter Kontrolle der HoxB7-, E2*early*- (E2e) und Cyklin G-Promotoren und des TdT-Initiators exprimieren, mittels PEI-Methode transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Luciferase mit den unterschiedlichen Konstrukten bestimmt. Die Werte wurden mit der *Renilla*-Luciferase, die als Kontrolle kotransfiziert wurde, normiert. **C** Die Lysate wurden auf 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Antikörpern gegen E1A (610), E4orf6/7 (RSA3) und β-Aktin und mit den jeweiligen HRPO-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert.

Neben der erhöhten Expression von HoxB7 zu frühen Zeitpunkten der Infektion konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Reduktion des Proteins zu späteren Zeitpunkten festgestellt werden. Um dies genauer zu untersuchen, wurden H1299 Zellen mit dem Wildtypvirus sowie den Virusmutanten H5*pm*4149, H5*pm*4166 und H5*pm*4154 infiziert, nach 48 h geerntet und Gesamtzelllysate hergestellt (s. 3.8.3). Die Expressionsspiegel von HoxB7 und anderen zellulären

Proteinen wurden mittels *Western Blot* analysiert (s. 3.8.6). In mit dem Wildtyp infizierten Zellen ist eine Reduktion des HoxB7 Proteins, verglichen mit nicht infizierten Zellen zu sehen (Abb. 4.36 Spur 2). Eine starke Reduktion ist in Zellen, die mit dem H5pm4166 Virus infiziert sind, zu beobachten (Abb. 4.36 Spur 3). Bei dieser Virusmutante ist die E4orf6 Expression verglichen mit den anderen Viren besonders hoch. Eine im Vergleich zum Wildtyp schwächere Reduktion der HoxB7 Menge ist in E4orf6- und E1B-55K-negativen Viren zu sehen (Spuren 4, 5). Dennoch wird auch hier eine geringe Reduktion gegenüber den nicht infizierten Zellen deutlich. Die Menge von Mre11, das als Substrat der E3-Ubiquitin Ligase bekannt ist, ist im Wildtypvirus und dem H5pm4166 Virus nicht nachweisbar (Spuren 2, 3), während es in mit E4orf6- und E1B-55K-negativen Viren infizierten Zellen exprimiert ist (Spuren 4, 5). Auch hier sind die Mengen etwas geringer als in nicht infizierten Zellen.



**Abbildung 4.36: Untersuchung zur Expression von HoxB7.** H1299 Zellen wurden mit H5pg4100 sowie den Virusmutanten H5pm4149, H5pm4166 und H5pm4154 infiziert (moi 50), nach 48 h geerntet und Gesamtzellextrakt hergestellt (mock bedeutet nicht infiziert). Zur Überprüfung der Proteinexpression wurden diese (120 µg HoxB7, 40 µg Mre11, 40 µg E1B-55K, 50 µg E4orf6, 20 µg β-Aktin) auf 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Antikörpern gegen HoxB7, Mre11, E1B-55K (2A6), E4orf6 (RSA3) und β-Aktin mit den jeweiligen HRPO-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert.

Die Daten zeigen einen Unterschied bei der Reduktion der Expression von HoxB7 und Mre11, die im Falle von HoxB7 E4orf6-abhängig zu sein scheint. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen Effekt, der nicht auf Proteinebene sondern auf transkriptioneller Ebene stattfindet. Eine Regulation der HoxB7 Expression im Verlauf einer Virusinfektion sowie die daran beteiligten viralen und zellulären Faktoren müssen in weiteren Versuchen genauer untersucht werden.

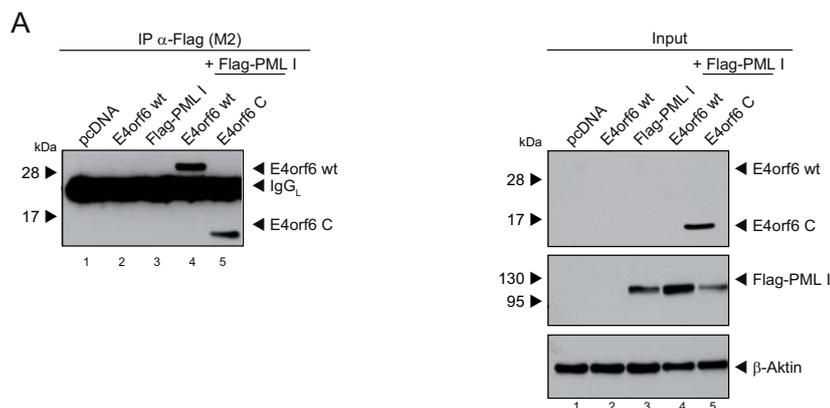
## 4.7 Analysen zur Interaktion von PML mit E4orf6

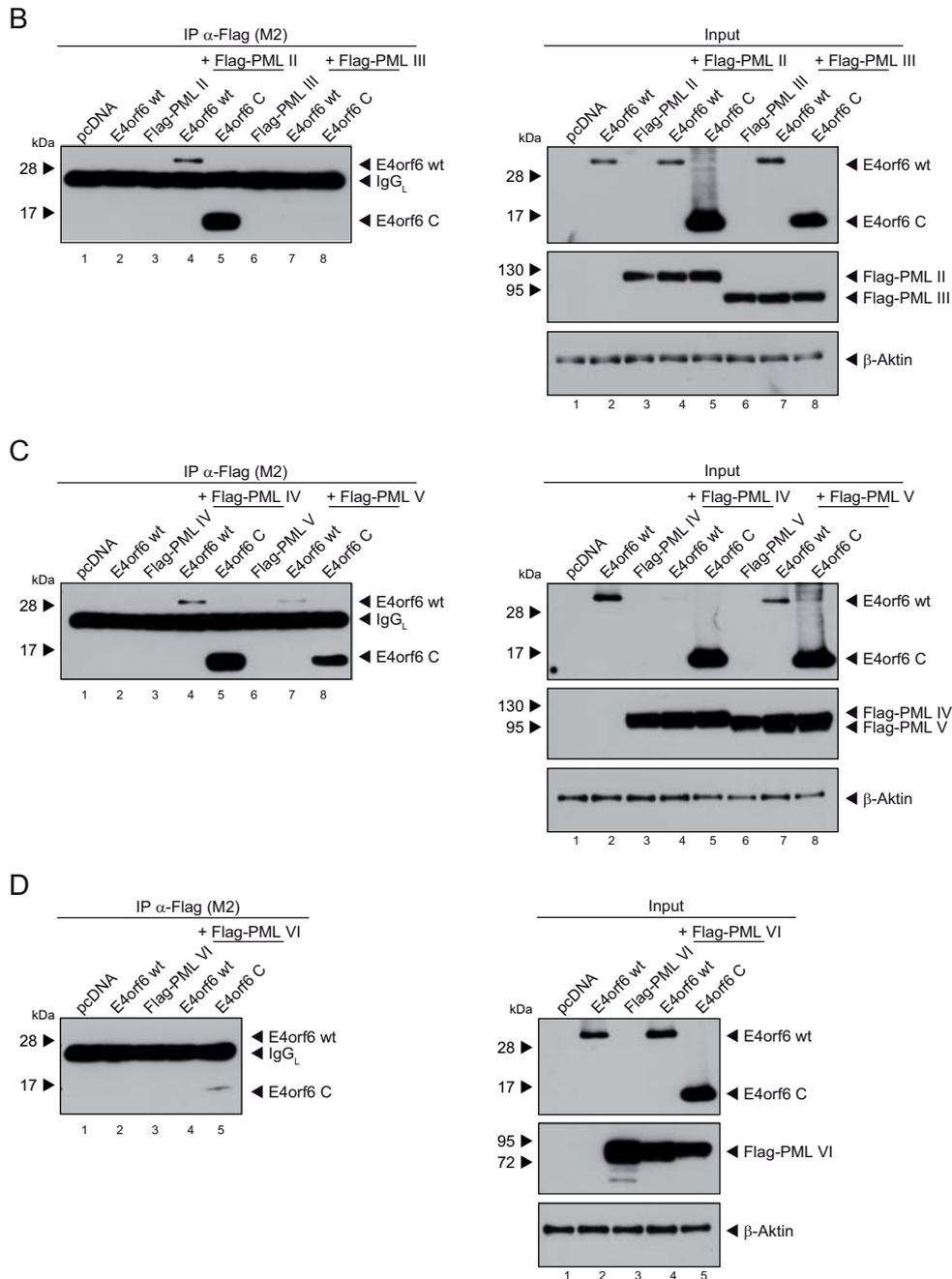
Zelluläre PML Proteine sind die Hauptkomponenten der PML-NB und spielen damit eine wichtige Rolle bei zahlreichen zellulären Prozessen wie Transkriptionsregulierung, zellulärer

Seneszenz, Tumorsuppression, DNA Reparatur, Apoptose und epigenetischer Regulation. In verschiedenen humanen Tumorarten konnte eine Fehlregulation dieses Tumorsuppressors festgestellt werden. Ferner konnte in zahlreichen Arbeiten gezeigt werden, dass die Genprodukte von verschiedenen DNA- und RNA-Viren mit den PML-NBs interagieren (s. 1.4). Für Adenoviren wurde zunächst lediglich eine Interaktion mit dem E4orf3 Protein gezeigt, kürzlich konnten jedoch auch E1A und E1B-55K als Interaktionspartner identifiziert werden (Wimmer, 2010; Wimmer *et al.*, 2010a). Interessanterweise wurde auch die Interaktion von E4orf6 mit verschiedenen PML-Isoformen sowohl in transfizierten Zellen als auch während der Virusinfektion aufgedeckt (Wimmer, 2010).

#### 4.7.1 Identifizierung der Binderegion von PML im E4orf6 Protein

Nachdem eine Interaktion von E4orf6 mit PML gezeigt werden konnte, wurde diese Interaktion nun genauer untersucht. Unter den zahlreichen Funktionen dieser zellulären Proteine ist ihre Rolle bei der Onkogenese hier von besonderem Interesse. Die Tatsache, dass zahlreiche Tumorsuppressorproteine wie p53, die Transkriptionsfaktoren Daxx und Sp100, das PML Protein selbst sowie virale Onkoproteine wie E1A, E1B-55K und E4orf3 gemeinsam in den PML-NBs lokalisieren und diese Kerndomänen bei der malignen Erkrankung APL und anderen neuronalen Tumorerkrankungen eine Rolle spielen, lässt eine Beteiligung der PML-NBs sowie seiner Komponenten bei der Adenovirus-vermittelten Transformation vermuten. Um einen Einfluss des PML Proteins auf die E4orf6-abhängige Erhöhung der Transformationsrate von Nagetierzellen zu untersuchen wurde zunächst getestet, ob das zelluläre Protein mit dem C-Terminus, der für die Erfüllung dieser Funktion hinreichend ist, interagieren kann. Dafür wurden H1299 Zellen mittels PEI-Methode mit Plasmiden transfiziert, die für PML und E4orf6 kodieren (s. 3.3.4.1). Zum einen handelte es sich hierbei um die verschiedenen PML-Isoformen (I bis VI), welche mit einer Flag-Markierung versehen sind, zum anderen um HA-markierte E4orf6 Proteine (Volllänge- und Onko-Protein). Nach Zellernte und Herstellung von Gesamtzelllysaten (s. 3.8.3) wurden Koimmunpräzipitationsversuche durchgeführt (s. 3.8.8.2). Wie die Abbildung 4.37 zeigt, interagiert, konsistent mit den vorherigen Versuchen (Wimmer, 2010), das Wildtyp-E4orf6-Protein mit den PML-Isoformen I, II, IV und V (Abb. 4.37 A, B, C, D; Spur 4).

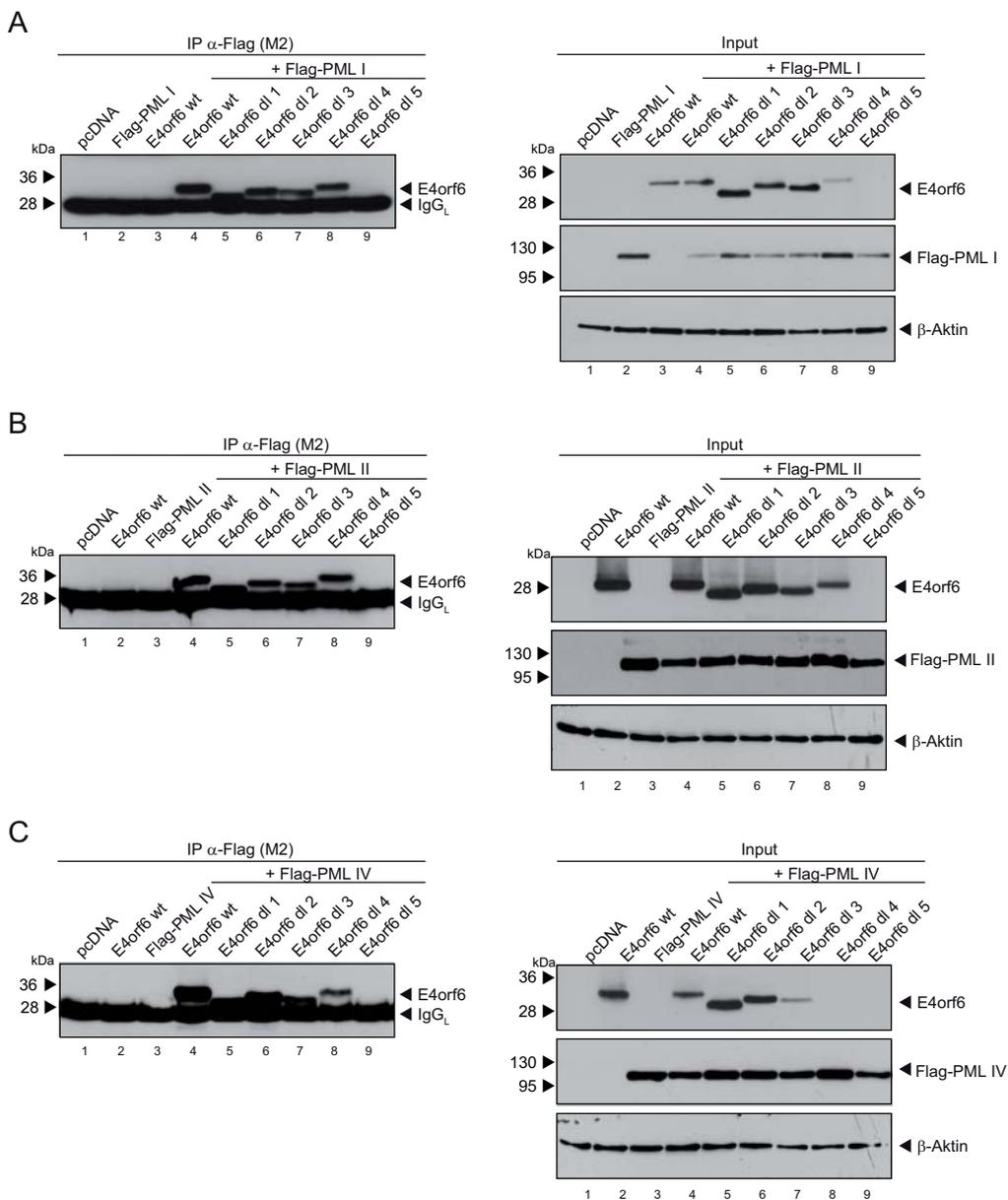


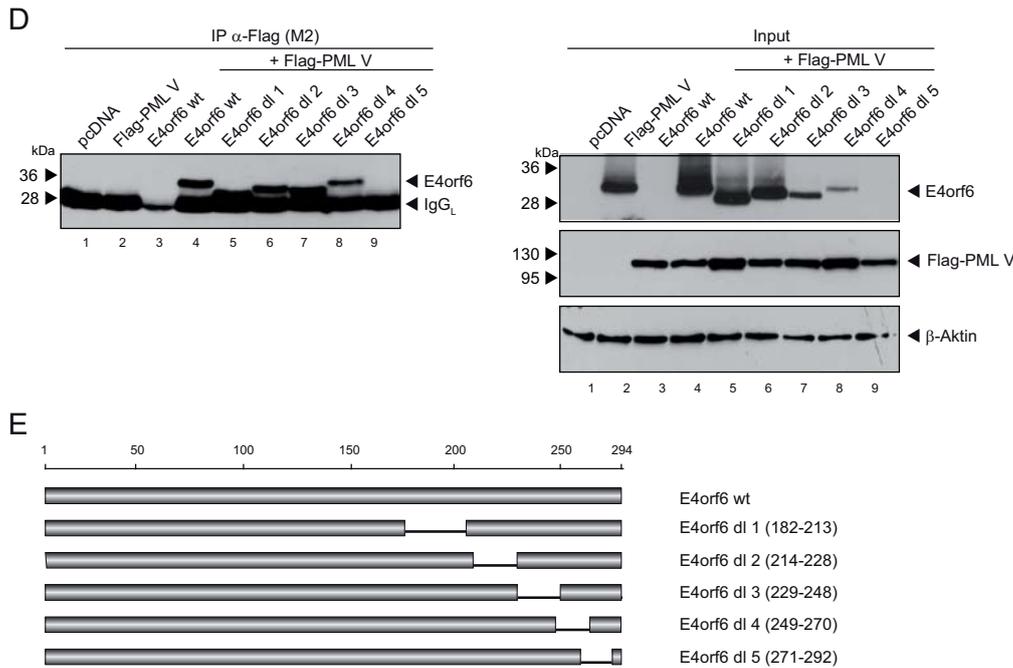


**Abbildung 4.37: Interaktion von E4orf6 mit PML in transfizierten H1299 Zellen.** Die Zellen wurden transfiziert, 48 h p.t. geerntet und Gesamtzellextrakte hergestellt. Zur Überprüfung der Expression wurden diese (40  $\mu$ g E4orf6-HA, 60  $\mu$ g Flag-PML und 20  $\mu$ g  $\beta$ -Aktin) mittels 10%iger (12%ige bei E4orf6) SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen E4orf6-HA (3F10), Flag-PML (Flag-M2) und  $\beta$ -Aktin (AC-15) als Ladekontrolle sowie den entsprechenden HRPO-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert. Zur Koimmunpräzipitation wurden 0,5 mg Zellysate zuvor mit dem Flag-M2-Antikörper immunpräzipitiert, über 12%ige SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit einem Antikörper gegen E4orf6-HA (3F10) sowie dem entsprechenden HRPO-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. In **A** bis **D** sind die verschiedenen PML-Isoformen (I bis VI) eingesetzt worden.

Darüber hinaus kann diese Interaktion auch mit der Onkodomäne alleine beobachtet werden (Abb. 4.37 A, B, C, D; Spur 5). Die mit PML interagierende Region liegt also im C-Terminus des viralen Proteins.

Zur weiteren Eingrenzung der Binderegion wurden im Folgenden E4orf6 Konstrukte verwendet, die Deletionen in C-Terminus von jeweils etwa 10 Aminosäuren besitzen. Mit diesen Proteinen sowie den PML-Isoformen I, II, IV und V wurde eine Kopräzipitation, wie oben beschrieben, durchgeführt. Hierbei zeigt sich, dass Deletionen im Bereich der Aminosäuren 182 bis 270 keinen Einfluss auf die Interaktion von E4orf6 und PML haben (Abb. 4.38 Spuren 5-8). Lediglich eine der E4orf6 Deletionsmutanten kann nicht durch PML kopräzipitiert werden, jedoch ist hier auch keine Expression von E4orf6 nachweisbar (Abb. 4.38 Spur 9). Somit muss der für die Interaktion mit PML verantwortliche Bereich zwischen den Aminosäuren 271 und 292 liegen.

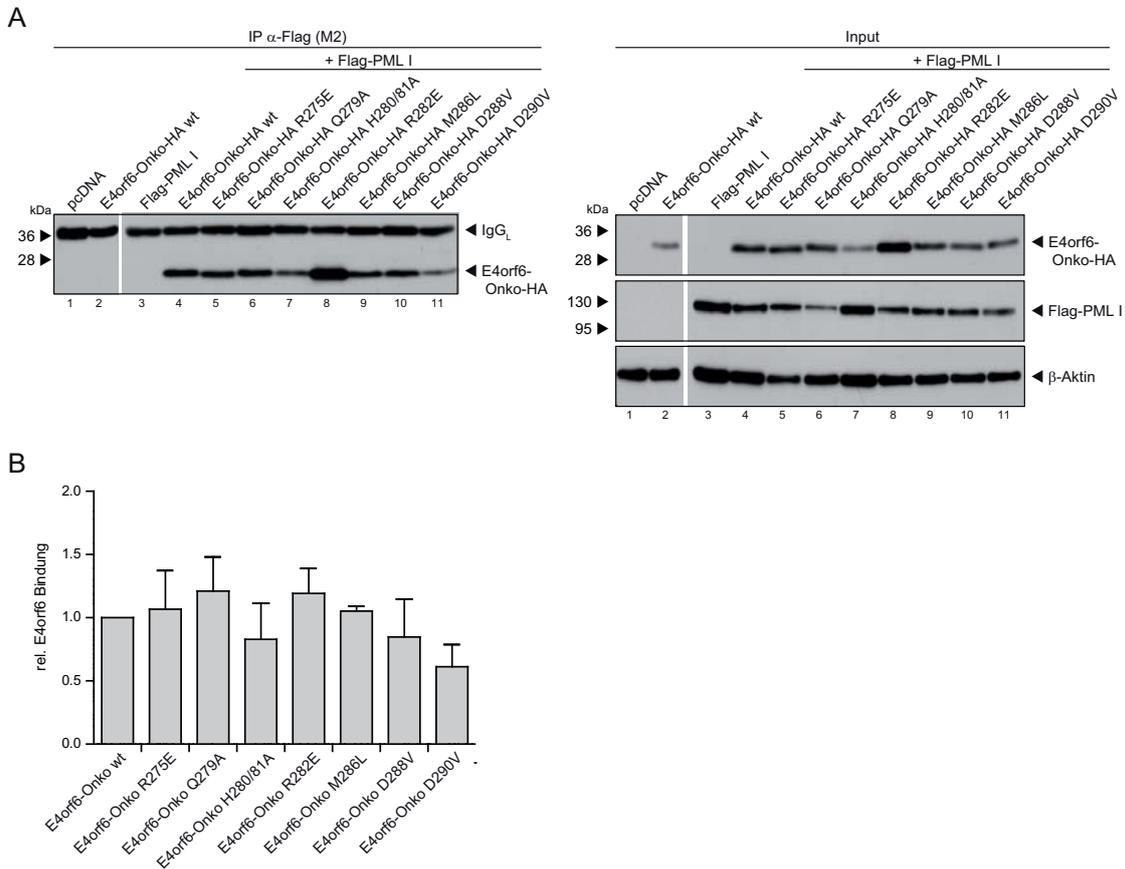




**Abbildung 4.38: Interaktion von E4orf6-Deletionsmutanten mit PML in transfizierten H1299 Zellen.** Die Zellen wurden transfiziert, 48 h p.t. geerntet und Gesamtzellextrakte hergestellt. Zur Überprüfung der Expression wurden diese (40  $\mu$ g E4orf6-HA, 60  $\mu$ g Flag-PML und 20  $\mu$ g  $\beta$ -Aktin) mittels 10%iger (12%ige bei E4orf6) SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen E4orf6-HA (3F10), Flag-PML (Flag-M2) und  $\beta$ -Aktin (AC-15) als Ladekontrolle sowie den entsprechenden HRPO-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert. Zur Koimmunpräzipitation wurden 0,5 mg Zellysate zuvor mit dem Flag-M2-Antikörper immunpräzipitiert, über 12%ige SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit einem Antikörper gegen E4orf6-HA (3F10) sowie dem entsprechenden HRPO-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. In **A** bis **D** sind die PML-Isoformen (I, II, IV und V) eingesetzt worden. **E** zeigt die schematische Darstellung der verwendeten E4orf6-Deletionsmutanten.

Da jedoch die Deletion in diesem Bereich die Stabilität des Proteins stark beeinträchtigt, wurden Punktmutationen im Bereich der Aminosäuren 271 bis 290 eingeführt. Da der C-Terminus von E4orf6 für eine Interaktion mit PML ausreichend ist, wurden die Punktmutationen in diesem verkürzten Protein untersucht. Erneut wurde eine Koimmunpräzipitation von E4orf6 durch PML I, wie oben beschrieben, durchgeführt. Dabei zeigt sich zunächst, dass in diesem Fall keine Beeinträchtigung der Proteinstabilität durch die eingeführten Mutationen vorliegt, da alle E4orf6-Konstrukte stabil exprimiert werden (Abb. 4.39 A). Weiterhin wird deutlich, dass zwar alle verwendeten E4orf6-Punktmutanten noch in der Lage sind, mit PML I zu interagieren, manche jedoch schwächer als andere. Um diese Punktmutanten zu identifizieren, wurden die Bandenintensitäten des kopräzipitierten E4orf6 mit der Menge des eingesetzten Proteins (Input) densitometrisch bestimmt und ins Verhältnis gesetzt. Die Bindungsintensität der Punktmutanten wurde mit der unveränderten Onkodomäne verglichen. Um eine zuverlässige Aussage treffen zu können, wurde hierbei der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen bestimmt. Wie in der Abbildung 4.39 B zu sehen ist, weisen drei Punktmutanten

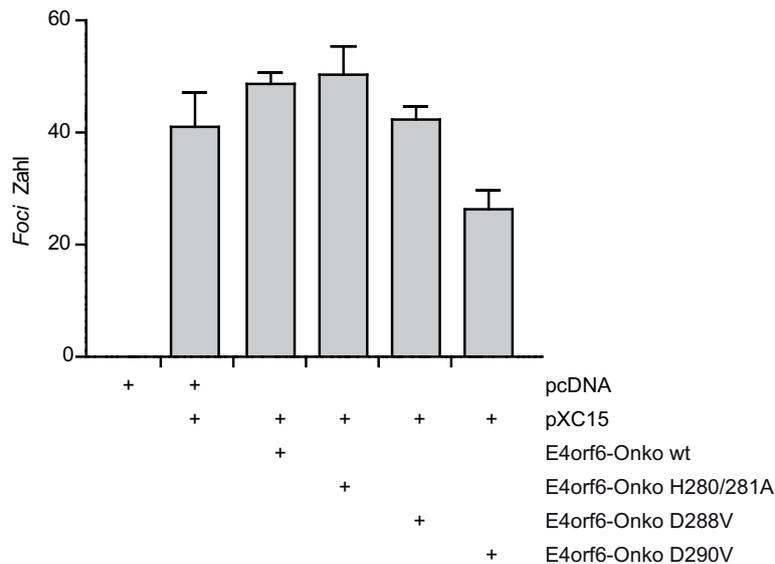
eine, gegenüber dem Wildtyp Protein, reduzierte PML-Bindung auf. Die E4orf6 Proteine mit den Mutationen H280/281A sowie D288V zeigen eine 20%ige Reduktion der Bindung, während die Interaktion des E4orf6 Proteins mit der Mutation D290V um 40% reduziert ist. Somit können als PML Interaktionsbereich die Aminosäuren 280, 281, 288 und 290 identifiziert werden.



**Abbildung 4.39: Interaktion von E4orf6-Punktmutanten mit PML in transfizierten H1299 Zellen.** Die Zellen wurden transfiziert, 48 h p.t. geerntet und Gesamtzellextrakte hergestellt. Zur Überprüfung der Expression wurden diese (40  $\mu$ g E4orf6-HA, 60  $\mu$ g Flag-PML und 20  $\mu$ g  $\beta$ -Aktin) mittels 10%iger (12%iger bei E4orf6) SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen E4orf6-HA (3F10), Flag-PML (Flag-M2) und  $\beta$ -Aktin (AC-15) als Ladekontrolle sowie den entsprechenden HRPO-gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert. Zur Koimmunpräzipitation wurden 0,5 mg Zellysate zuvor mit dem Flag-M2-Antikörper immunpräzipitiert, über 12%ige SDS-Gele aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit einem Antikörper gegen E4orf6-HA (3F10) sowie dem entsprechenden HRPO-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. **B** zeigt die relative Bindung der E4orf6-Punktmutanten und PML-I. Aus drei Versuchen wurden die Bandenintensitäten von E4orf6 von Input und der Kopräzipitation densitometrisch bestimmt und ins Verhältnis gesetzt, die Mittelwerte und Standardabweichungen sind dargestellt.

## 4.8 Analyse der Rolle von PML bei der Transformation durch adenovirale Genprodukte

Die im vorherigen Abschnitt identifizierten E4orf6-Punktmutanten sollten nun in einem Transformationsexperiment hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Transformationseffizienz zu erhöhen, analysiert werden. Hierfür wurden primäre Rattennierenzellen nach der PEI Methode (s. 3.3.4.1) mit Plasmiden transfiziert, die für E1A und E1B (pXC15), für das E4orf6-Onko Protein sowie E4orf6-Onko Punktmutanten kodieren. Das Medium wurde regelmäßig gewechselt und nach fünf Wochen konnten die Zellen mit Kristallviolett gefärbt und die Zahl der *Foci* bestimmt werden (s. 3.3.7). Wie der Abbildung 4.40 zu entnehmen ist, zeigt sich für den Ansatz, in dem zusätzlich zu E1A und E1B die E4orf6 Onkodomäne exprimiert wurde, eine leichte Erhöhung der Zahl transformierter Zellen gegenüber E1A und E1B alleine. Für die E4orf6 Punktmutanten D288V und D290V kann demgegenüber eine Reduktion der *Focus* Zahl um 15% bzw. 40% ausgemacht werden, während für die Punktmutante der Aminosäuren 280/281 kein Unterschied zu sehen ist. Die Reduktion der Interaktion der E4orf6 Mutanten D288V und D290V mit PML geht also mit einem Verlust der Fähigkeit, die Transformationseffizienz zu steigern, einher.



**Abbildung 4.40: Analyse des Einflusses von PML auf die Transformation primärer BRK Zellen.** Primäre BRK Zellen wurden mit Plasmiden, die für E1A und E1B (pXC15), E4orf6-Onko und E4orf6-Mutanten kodieren, nach der PEI-Methode transfiziert. Nach fünf Wochen wurden die transformierten Zellkolonien mit Kristallviolett gefärbt.

---

## 5 Diskussion

Seit mehreren Jahrzehnten ist bekannt, dass einige Vertreter unter den DNA- sowie den RNA-Viren die Entstehung von Tumoren induzieren können. Auch die Infektion mit Adenoviren oder die Expression von adenoviralen Genprodukten hat abhängig vom Virustyp, zumindest im Tiermodell, transformierendes Potential (vgl. 1.2.1). Als adenovirale Onkogene konnten die Proteine der E1-Region (E1A und E1B) sowie der E4-Region (E4orf3 und E4orf6) identifiziert werden (vgl. 1.2.2.1, 1.2.2.2). Das transformationsfördernde Potential dieser Genprodukte beruht dabei auf Eingriffen in den Wirtszellzyklus, wodurch in der lytischen Infektion eine maximale Virusproduktion gewährleistet werden soll. Dabei werden wichtige Signalwege manipuliert, was in manchen Fällen durch einen komplexen mehrstufigen Prozess auch zur Onkogenese führen kann.

Das virale Protein E1A ist durch die Interaktion mit wichtigen zellulären Regulatoren in der Lage, das Voranschreiten des Zellzyklus anzutreiben. Ein Resultat hieraus ist jedoch auch die Stabilisierung des Tumorsuppressors p53, was wiederum Zellzyklusarrest und verfrühte Apoptose der Zelle mit sich bringt (Branton *et al.*, 1985; Endter und Dobner, 2004; Dyson *et al.*, 1989; Debbas und White, 1993; Lowe und Ruley, 1993; Grand *et al.*, 1994; Sabbatini *et al.*, 1995; Mymryk *et al.*, 1994). Allerdings kann das E1B-55K Protein durch die Repression von p53 und dessen Sequestration im Zytoplasma diesen Prozess abwenden (Sarnow *et al.*, 1982a; Kao *et al.*, 1990; Yew *et al.*, 1994; Martin und Berk, 1998, 1999; Endter *et al.*, 2001, 2005). Die Proteine E4orf3 und E4orf6 der E4-Region können die E1-abhängige Transformation deutlich verstärken (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997, 1999a,b). Das E4orf6 Protein kann mit E1B-55K sowie einigen zellulären Proteinen eine E3-Ubiquitin-Ligase assemblieren, welche durch Polyubiquitinierung von Substraten wie Mre11 und p53 deren proteasomalen Abbau induziert (Baker *et al.*, 2007; Blanchette *et al.*, 2004, 2008; Dallaire *et al.*, 2009a,b; Harada *et al.*, 2002; Querido *et al.*, 1997, 2001a,b). Die E4orf6-abhängige starke Erhöhung der Onkogenität in Versuchstieren ist dabei von dieser p53-Destabilisierung abhängig, während sie für die verstärkte Zelltransformation nicht nötig ist (Nevels *et al.*, 2000).

### 5.1 Die Onkodomäne des E4orf6 Proteins ist für die produktive Infektion nicht ausreichend

Die C-terminale Onkodomäne des E4orf6 Proteins konnte als ausreichend identifiziert werden, die Transformationsrate von primären Nagetieren in einer dem Wildtypprotein ähnlichen

Weise zu steigern (Nevels *et al.*, 2000). Nachdem dieser Teil des Proteins als essentiell für die produktive Infektion (Orlando und Ornelles, 1999) sowie für die Transformation identifiziert wurde, ist anzunehmen, dass beide Funktionen eng miteinander verknüpft sind (Nevels *et al.*, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit war es daher von Interesse zu untersuchen, ob diese Proteindomäne wie in der Transformation auch in der produktiven Infektion ausreichend ist, die E4orf6 Proteinfunktionen zu erfüllen.

Bereits seit etwa 25 Jahren ist die Unerlässlichkeit des E4orf6 Proteins für die maximale Produktion von späten Strukturproteinen und Virusnachkommen bekannt (Halbert *et al.*, 1985). Dabei hat das multifunktionale Protein Aufgaben auf verschiedenen Ebenen der Genexpression. Es ist dabei u. a. für das korrekte Spleißen der späten viralen RNAs (Öhman *et al.*, 1993; Nordqvist *et al.*, 1994) sowie deren Export ins Zytoplasma wichtig (Halbert *et al.*, 1985; Weinberg und Ketner, 1986; Beltz und Flint, 1979). Eine weitere sehr wichtige Aufgabe kommt dem von E4orf6 und E1B-55K assemblierten Ligasekomplex zu, indem der Abbau zellulärer Substrate wie Mre11, p53, DNA-Ligase IV, Integrin  $\alpha 3$  und der Bloom Helikase induziert wird (Querido *et al.*, 1997, 2001a,b; Baker *et al.*, 2007; Blanchette *et al.*, 2004, 2008; Dallaire *et al.*, 2009a,b; Harada *et al.*, 2002; Steegenga *et al.*, 1998; Stracker *et al.*, 2002; Orazio *et al.*, 2011). Wie durch CD-Spektroskopie und die Berechnung anhand von Computermodellen gezeigt wurde, ist die Onkodomäne von E4orf6 vermutlich eine eigenständige Proteindomäne (Brown *et al.*, 2001; Orlando und Ornelles, 1999). Die Expression dieses Teils von E4orf6 ist auch in den in dieser Arbeit hergestellten Virusmutanten H5pm4182 und H5pm4229 möglich, wobei das Protein eine geringere Expressionsmenge zeigt als das Volllängeprotein (Abb. 4.3). Der Grund hierfür ist höchstwahrscheinlich eine geringere Stabilität dieser veränderten Proteine. Besonders in Mio-M1 Zellen kann eine starke Reduktion der Proteinexpression beobachtet werden. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit vermuten lassen, hat die Interaktion von E4orf6 mit HoxB7 einen Einfluss auf die Stabilität des viralen Proteins (Abb. 4.25). Konsistent zur Literatur konnte beobachtet werden, dass die Expression von HoxB7 in Tumorzellen erhöht ist (Abb. 4.14). Auch in Mio-M1 Zellen ist die Expression dieses Proteins schwächer als in den Tumorzelllinien H1299 und A549. Die Tatsache, dass die Antikörpererkennung durch den 1807 Antikörper in diesen mutierten Proteinen nicht mehr vollständig gegeben ist, spricht für eine veränderte Tertiärstruktur der Proteine. Es ist keine Kristallstruktur von E4orf6 vorhanden, aber anhand von Strukturvergleichen wurde mittels Computeranalyse ein Modell der Tertiärstruktur von E4orf6 berechnet. Nach diesem Modell nimmt der C-Terminus und der zentrale Bereich eine TIM-Barrel-Struktur ein, während der N-Terminus über einen Linkerbereich flexibel ist und sich dem TIM-Barrel nähern kann (Brown *et al.*, 2001). In beiden Onko-Viren ist der flexible Linkerbereich und der Großteil des TIM-Barrels nicht vorhanden, was vermutlich die Struktur beeinflusst. Vergleicht man die Expression der beiden Onko-Proteine untereinander, so wird deutlich, dass das Protein, das zusätzlich an Aminosäureposition 245 eine Punktmutation trägt, besonders schwach exprimiert ist. Möglicherweise bewirkt der Aminosäureaustausch eine zusätzliche Strukturveränderung. Wie in früheren Studien gezeigt werden konnte, ist durch das Einführen dieser Punktmutation die Konformation der  $\alpha$ -Helix gegenüber dem Wildtypprotein reduziert (Orlando und Ornelles, 1999).

Die Deletionen im E4orf6 Protein haben keinen Einfluss auf die Expression der frühen viralen Proteine E1B-55K und E2A, während in allen Mutanten erhöhte E1A Expressionsspiegel beobachtet werden können (Abb. 4.4). Der Grund hierfür ist vermutlich die negative Regulation der E1A Expression auf transkriptioneller Ebene durch das E4orf6 Protein, welche in dieser Arbeit aufgedeckt wurde (vgl. 5.6). Die Tatsache, dass bei den Viren H5pm4182 und H5pm4229 eine verlängerte Expression von E1A zu beobachten ist, spricht für den Verlust der regulatorischen Aktivität der E4orf6 Proteine in diesen Viren. Auch bezüglich des Abbaus von p53 und Mre11, die exemplarisch für alle Substrate untersucht wurden, sind die Proteine dieser beiden Viren offensichtlich nicht funktionell (Abb. 4.6). Experimente zur Aufklärung der Struktur der E3-Ubiquitin-Ligase konnten zeigen, dass das E4orf6 Protein drei Sequenzabschnitte enthält, mit denen die Elongine B und C interagieren (Blanchette *et al.*, 2004, 2008). In den in dieser Arbeit hergestellten Virusmutanten ist nur die erste so genannte BC-Box enthalten (Abb. 4.2), die laut Literaturangaben und ebenfalls in dieser Arbeit nicht ausreichend ist, den Ligasekomplex zu assemblieren (Blanchette *et al.*, 2004). Doch auch unabhängig von E1B-55K ist E4orf6 in der Lage, mit p53 zu interagieren und dessen transaktivierende Funktionen zu inhibieren (Dobner *et al.*, 1996). Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Funktion von E4orf6 zwar nicht untersucht, aufgrund der weitgehenden Deletion des vermuteten p53-Interaktionsbereichs in den Viren H5pm4182 und H5pm4229 (Abb. 4.2) ist eine Repression vermutlich nicht mehr möglich. In weiterführenden Experimenten müsste diese Frage beantwortet werden.

Auch hinsichtlich der Produktion von späten Strukturproteinen weisen die in dieser Arbeit hergestellten Viren einen starken Defekt auf (Abb. 4.5). Jedoch fällt auf, dass in A549 Zellen dieser Defekt nicht so groß ist, wie in den anderen Zelllinien. Das E4orf6 Protein hat Einfluss auf die späten viralen Transkripte, indem es auf mRNA Ebene ihre Stabilität und zusammen mit E4orf3 ihr korrektes Spleißen gewährleistet. Wie dieser Mechanismus auf molekularer Ebene genau abläuft und welche weiteren Faktoren daran beteiligt sind, ist bisher unklar (Öhman *et al.*, 1993; Nordqvist *et al.*, 1994), daher wurden in dieser Arbeit hierzu keine Untersuchungen mit den Virusmutanten durchgeführt. Eine weitere, für die Expression später Genprodukte entscheidende Funktion von E4orf6, ist der Export der späten mRNAs ins Zytoplasma, wobei die zellulären mRNAs zurückgehalten werden (Babiss *et al.*, 1985; Halbert *et al.*, 1985; Pilder *et al.*, 1986; Cutt *et al.*, 1987; Huang und Haring, 1989; Bridge und Ketner, 1990). Wie genau dieser Transport abläuft ist unklar, die Interaktion mit E1B-55K ist jedoch, wie mehrere Studien zeigen, Voraussetzung hierfür. Es wird vermutet, dass durch die Wirkung der E3-Ligase ein bisher unbekanntes Protein abgebaut wird, was die Voraussetzung für den effizienten Export darstellt (Woo und Berk, 2007). Da in den Virusmutanten H5pm4182 und H5pm4229 kein funktionsfähiger Ligasekomplex vorhanden ist, kann angenommen werden, dass auch ein effizienter Export durch E4orf6 nicht erfolgt. Zur Bestätigung dieser Vermutung müsste allerdings in weiteren Experimenten das Verhältnis der späten mRNAs im Zytoplasma und im Zellkern verglichen werden.

Der Export der späten viralen mRNAs ist von der Bewegung von E1B-55K und E4orf6 zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma abhängig. Doch der Mechanismus des Im- und Exports dieser beiden Proteine wird kontrovers diskutiert. So ist die Bedeutung und die ge-

nerelle Funktionalität des NES im N-Terminus des E4orf6 Proteins nicht zufriedenstellend geklärt (Dobbelstein *et al.*, 1997; Goodrum *et al.*, 1996; Rabino *et al.*, 2000). In den, in dieser Arbeit hergestellten, Onko-Viren ist diese Signalsequenz nicht vorhanden, die subzelluläre Lokalisation der E4orf6 Proteine diffus im Zellkern. Da aber auch im Falle eines wechselseitigen Transportes das Gleichgewicht auf der Zellkernseite ist, lässt die mit der Immunfluoreszenz gegebene Momentaufnahme keine Aussage darüber zu. Dies müsste in weiteren Versuchen beantwortet werden. Ebenso strittig wie die Funktion des NES im E4orf6 Protein ist der Einfluss dieses viralen Genprodukts auf die Lokalisation von E1B-55K. Während manche Autoren beobachten konnten, dass E1B-55K in der Lage ist, ohne weitere virale Proteine in den Zellkern zu gelangen (Krätzer *et al.*, 2000), nehmen andere an, dass dies von E4orf6 abhängt (Orlando und Ornelles, 1999; Marshall *et al.*, 2008). Hier ermöglicht E4orf6 die Umlokalisation des anderen viralen Proteins von der nukleären Matrix hin zu den viralen Replikations- und Transkriptionszentren (Lethbridge *et al.*, 2003; Ornelles und Shenk, 1991; Gonzalez und Flint, 2002). Für die Viren H5pm4182 und H5pm4229 konnten bezüglich der Lokalisation von E1B-55K Unterschiede in den verschiedenen Zellen beobachtet werden (Abb. 4.7, Abb. 4.8). Während in H1299 Zellen das E4orf6 Protein dieser Viren, ebenso wie bei den anderen E4orf6 Mutanten, nicht in der Lage ist, E1B-55K in den Zellkern zu bringen, ist diese Funktion in A549 Zellen teilweise erfüllt.

Die Fähigkeit, E1B-55K in den Zellkern zu bringen, ist mit der Interaktion der beiden viralen Proteine verknüpft. In verschiedenen Studien zur Identifizierung des Interaktionsbereichs wurden dabei unterschiedliche Ergebnisse erzielt, da sowohl Bereiche im N-Terminus als auch im C-Terminus als nötig befunden wurden (Rubenwolf *et al.*, 1997; Weigel und Dobbelstein, 2000). In den, in dieser Arbeit hergestellten, Viren sind sowohl der N- als auch der C-Terminus enthalten, daher ist davon auszugehen, dass eine Interaktion der beiden viralen Genprodukte vorhanden ist, obwohl dies nicht untersucht wurde. Zur Identifizierung des mit E1B-55K interagierenden Bereichs von E4orf6 unter den Bedingungen einer Infektion müsste eine neue Virusmutante hergestellt werden, die nur die Onkodomäne, ohne das N-terminale Fragment, enthält. Dieses Virus sollte aber ausschließlich für Bindungsstudien eingesetzt werden, da es aller Wahrscheinlichkeit nach wegen des Fehlens von E4orf6/7 in der produktiven Infektion defekt ist.

Der Verlust der Funktionalität von E4orf6 in den E4orf6-Onko-Viren wird bei der Analyse der Produktion von Virusnachkommen erneut bestätigt (Abb. 4.11). Wegen der deutlich reduzierten Expression der späten Strukturproteine ist auch die Produktion von Virusnachkommen nicht effizient. Allerdings ergeben sich, wie bereits zuvor, Zelllinien-spezifische Unterschiede. Auch in diesem Fall ist der Defekt in A549 Zellen nicht so groß wie in den anderen Zelllinien. Diese Zelltyp-spezifischen Unterschiede sind zum einen vermutlich damit zu erklären, dass es sich bei den Mio-M1 Zellen um quasi primäre Zellen handelt, in denen die Virusinfektion generell langsamer und schlechter abläuft. Aber auch der Vergleich der Tumorzellen untereinander macht Unterschiede sichtbar. Möglicherweise spielt die Expression von p53 in diesen Zellen eine Rolle, nachdem A549 Zellen p53 enthalten, während H1299 Zellen dagegen p53 negativ sind. Bereits in vorherigen Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass E4orf6 in manchen Zelllinien für eine effiziente Infektion nötig ist und in anderen nicht. So ist die An-

wesenheit des Genproduktes in A549 Zellen nicht zwingend erforderlich (Halbert *et al.*, 1985; Smiley *et al.*, 1990). Der genaue Grund für den nicht so starken Defekt dieser Virusmutanten in diesen Zellen muss in weiterführenden Experimenten ermittelt werden.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen in dieser Arbeit, dass die Onkodomäne nicht ausreichend ist, die Funktionen von E4orf6 in der produktiven Virusinfektion zu erfüllen, während dieser Teil des Proteins für die verstärkte Transformation hinreichend ist. Für die Erhöhung der Transformationsrate und die morphologische Hypertransformation ist der Abbau von p53 nicht zwingend erforderlich, wohingegen die E4orf6-abhängige verstärkte Onkogenität die Destabilisierung des zellulären Proteins benötigt (Nevels *et al.*, 2000). Für eine produktive Infektion allerdings ist der Abbau von p53 und der anderen Substrate vermutlich entscheidend. Daneben sind aber höchstwahrscheinlich auch andere, mit der E3-Ligase verbundene, Funktionen wie der mRNA Transport und die Lokalisation von E1B-55K sehr wichtig.

## 5.2 HoxB7 ist ein neuer zellulärer Interaktionspartner von E4orf6

Das transformationsfördernde Potential des E4orf6 Proteins beruht nicht, wie zuvor angenommen, auf der Destabilisierung von p53 durch die durch E1B-55K und E4orf6 assemblierte E3-Ubiquitin-Ligase (Nevels *et al.*, 2000). In dieser Arbeit sollte daher ein möglicher neuer, p53-unabhängiger, Mechanismus der E4orf6-vermittelten Transformation aufgedeckt werden. Auch für das virale Onkogen E6 des Humanen Papillom Virus 16 wurde ein p53-unabhängiger Mechanismus gefunden (Liu *et al.*, 1999; Inoue *et al.*, 1998). Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse der letzten Jahre, dass dies auch auf E1B-55K zutrifft. Ein Einfluss von Mre11, Daxx und PML auf die E1B-55K-abhängige Transformation sind wahrscheinlich (Härtl *et al.*, 2008; Sieber und Dobner, 2007; Schreiner *et al.*, 2010; Wimmer, 2010). In Versuchen zur Identifizierung des für das transformationsfördernde Potential verantwortlichen Bereichs im E4orf6 Protein wurde der C-Terminus als ausreichend befunden (Nevels *et al.*, 2000). Dieser Abschnitt des viralen Proteins, der eine eigenständige Proteindomäne darstellt, enthält, wie durch CD-Spektroskopie gezeigt wurde, eine Arginin-reiche amphipatische  $\alpha$ -Helix mit einer hydrophilen und einer hydrophoben Seite (Orlando und Ornelles, 1999, 2002). Arginin-reiche amphipatische  $\alpha$ -Helices sind für die Protein-Protein Interaktionen bei einigen Proteinen verantwortlich gemacht worden (Baur *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1995, 1997; Wang *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1997). Diese Domäne ermöglicht höchstwahrscheinlich auch im E4orf6 Protein die Interaktion von verschiedenen zellulären Proteinen an den unterschiedlichen Argininresten auf der hydrophilen Seite, durch die die vielen unterschiedlichen Funktionen des Proteins möglich sind (Orlando und Ornelles, 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten in einem Hefe-Zwei-Hybrid *Screen* einer B-Zell Bibliothek drei neue zelluläre Interaktionspartner der E4orf6-Onkodomäne gefunden werden (Tab. 4.1). Die Bindung von E4orf6 an HoxB7 konnte anschließend sowohl *in vitro* (Abb. 4.13) als auch in transfizierten (Abb. 4.15) und in infizierten Zellen (Abb. 4.16) bestätigt werden. Interessanterweise wurde in früheren Untersuchungen ein bislang unbekanntes Protein mit einem geschätzten Molekulargewicht von etwa 27 kDa als Interaktionspartner von E4orf6 gefunden (Boivin

*et al.*, 1999). Es ist durchaus möglich, dass es sich bei diesem Protein um HoxB7 handelt, welches ein Molekulargewicht von 24 kDa hat.

Sowohl im Hefe-Zwei-Hybrid Experiment als auch in der Transfektion ist der C-Terminus von E4orf6, die Onkodomäne, für die Interaktion mit HoxB7 ausreichend, während in der Infektion mit den Viren H5pm4182 und H5pm4229 die veränderten E4orf6 Proteine nicht durch das zelluläre Genprodukt kopräzipitiert werden können (Abb. 4.16). Wie bereits zuvor diskutiert wurde, könnte die Deletion im E4orf6 Protein dieser Viren eine veränderte Tertiärstruktur hervorrufen, die die Interaktion mit HoxB7 unmöglich macht. Zur Untersuchung der Interaktion der beiden Proteine in der Infektion sollte eine Virusmutante verwendet werden, die nur den C-Terminus und nicht den N-terminalen Abschnitt von E4orf6 enthält. Aber auch andere virale Faktoren könnten die Interaktion der beiden Proteine beeinträchtigen, wie die weiteren Experimente dieser Arbeit vermuten lassen (vgl. 5.3). Auch in dem durchgeführten GST-*pull down* Experiment (Abb. 4.18) kann der C-Terminus von E4orf6 nicht mit HoxB7 interagieren. In diesem Fall beeinträchtigt möglicherweise der GST-Anteil die Interaktion der beiden Proteine. Aber auch posttranslationale Modifikationen, wie beispielsweise Phosphorylierung, könnten für eine Bindung nötig sein, erfolgen in diesem experimentellen System allerdings nicht.

In den Kopräzipitationsexperimenten in der Infektion konnte in dieser Arbeit eine verstärkte Interaktion zwischen HoxB7 und E4orf6 in Abwesenheit von E1B-55K oder mit mutiertem E4orf6, das nicht mehr an die zellulären Komponenten des Ligasekomplexes binden kann, beobachtet werden (Abb. 4.17). Es wird daher angenommen, dass nur der Teil von E4orf6 mit HoxB7 interagiert, der nicht an E1B-55K oder die E3-Ubiquitin-Ligase gebunden ist. Auch in der Literatur wurde von mehreren Autoren beschrieben, dass nicht alles in der Zelle vorhandene E4orf6 an E1B-55K bindet. So wurde sowohl in Immunfluoreszenz- als auch in Immunpräzipitations-Analysen beobachtet, dass in infizierten Zellen signifikante Mengen der beiden Proteine nicht miteinander assoziiert vorliegen. Dabei schwanken die Mengenangaben für den mit E1B-55K-assoziierten Teil von E4orf6 zwischen etwa 20% und 50% (Cutt *et al.*, 1987; Ornelles und Shenk, 1991; Smiley *et al.*, 1990). Daher wurde weiterhin angenommen, dass verschiedene funktionelle Formen von E4orf6 existieren (Rubenwolf *et al.*, 1997). Aufgrund dieser Beobachtungen und den Ergebnissen dieser Arbeit ist davon auszugehen, dass es mehrere Fraktionen von E4orf6 gibt, die unterschiedliche virale und zelluläre Proteine binden. Die Interaktion mit HoxB7 erfolgt mit der Fraktion, die nicht mit E1B-55K bzw. der E3-Ubiquitin-Ligase assoziiert ist.

Aufgrund der weiteren Daten dieser Arbeit (Abb. 4.25, Abb. 4.24 B) wird vermutet, dass entweder die Interaktion mit E1B-55K oder mit HoxB7 E4orf6 auf Proteinebene stabilisiert. Auch in der Literatur ist eine Stabilisierung des viralen Proteins durch Komplexbildung mit E1B-55K beschrieben worden. Darüber hinaus wurde vermutet, dass andere Proteine alleine oder zusammen mit E1B-55K hierbei eine Rolle spielen (Rubenwolf *et al.*, 1997). In anderen Experimenten wurde das E4orf6 Protein als weitgehend stabil beschrieben, jedoch konnte seine Reduktion in der Infektion nach 48 h nicht erklärt werden (Boivin *et al.*, 1999). Allerdings wurden diese Versuche in HeLa Zellen durchgeführt, in denen HoxB7 vorhanden ist (Abb. 4.14). Diese Daten stehen nicht im Widerspruch mit den hier erzielten und es ist daher

denkbar, dass die Stabilität von E4orf6 teilweise durch die Bindung an HoxB7 gegeben ist. Vielmehr könnte sie die Reduktion der E4orf6 Expression zu späteren Zeitpunkten in der Infektion erklären, da dann auch die Expression von HoxB7 abnimmt (Abb. 4.26 B, Abb. 4.36). Die Reduktion der E4orf6 Expression könnte mit fehlender HoxB7 Expression und daraus resultierender geringerer Stabilität erklärt werden.

Durch Verwendung von E4orf6-GST Konstrukten mit unterschiedlichen Deletionen sollten erste Hinweise über den mit HoxB7 interagierenden Bereich gewonnen werden. Die Ergebnisse dieses Versuches legen nahe, dass der Bereich im E4orf6 Protein, der mit HoxB7 interagiert, zwischen den Aminosäuren 224 und 271 liegt (Abb. 4.18). Der Interaktionsbereich könnte unter Einbezug der Ergebnisse des Transformationsexperiments (Abb. 4.19) weiter auf die Aminosäuren 224 bis 248 eingegrenzt werden, da nur in dieser E4orf6 Deletionsmutante ein Verlust der Funktionalität zu sehen ist (vgl. 5.7). Wie das Kopräzipitationsexperiment in der Infektion zeigt (Abb. 4.16), kann das E4orf6 Protein mit Mutation an der Aminosäureposition 245 (H5pm4115) mit HoxB7 interagieren, was die Vermutung bekräftigt, dass ein Bereich davor an der Interaktion beteiligt ist.

Aber auch ein Bereich im N-Terminus könnte mit HoxB7 interagieren, da eine sehr schwache Bindung für ein Fragment mit diesem Bereich und das E4orf6/7 Protein detektiert werden kann (Abb. 4.18). Im Falle von E4orf6/7 könnte allerdings auch der alternative C-Terminus dieses Proteins an der Bindung beteiligt sein. Es ist aber auch denkbar, dass Bereiche sowohl im N- als auch im C-Terminus gemeinsam die Bindung gewährleisten. Dies wäre aufgrund der für E4orf6 beschriebenen Tertiärstruktur (Brown *et al.*, 2001) durchaus möglich. Auch für die Bindung an E1B-55K sind in verschiedenen Experimenten Bereiche sowohl im N- als auch im C-Terminus von E4orf6 identifiziert worden (Rubenwolf *et al.*, 1997; Weigel und Dobbelstein, 2000). Der Grund für diese Unterschiede ist bislang nicht klar, könnte aber durch unterschiedliche experimentelle Bedingungen erklärt werden (zusammengefasst in Flint und Gonzalez, 2003). Zur genaueren Identifizierung des mit HoxB7 interagierenden Bereiches sollten Analysen mit E4orf6 Deletionsmutanten, die entweder nur den N- oder den C-Terminus enthalten, durchgeführt werden. Des Weiteren sollten Virusmutanten hergestellt werden, die nicht mehr mit HoxB7 interagieren können. Die Analyse dieser Viren z. B. hinsichtlich der Stabilisierung von E4orf6 kann weitere Aufschlüsse geben.

Nachdem in dieser Arbeit in verschiedenen Experimenten die Interaktion von E4orf6 mit HoxB7 bestätigt werden konnte, stellt sich die Frage, warum das virale Protein mit diesem für Entwicklungsprozesse entscheidenden Transkriptionsfaktor interagiert. Betrachtet man auch die Funktionen der anderen, im Hefe-Zwei-Hybrid Experiment gefundenen, mit E4orf6 interagierenden zellulären Proteine, ist auffällig, dass alle an der Transkription beteiligt oder anderweitig in den RNA Metabolismus involviert sind (Thebault *et al.*, 2000; Gautier *et al.*, 2005; Al-Maghrebi *et al.*, 2002; Corbi *et al.*, 2010). Ein weiteres Protein, für das eine funktionelle Interaktion mit E4orf6 gezeigt werden konnte, ist RUNX-1 (Marshall *et al.*, 2008), das als Transkriptionsaktivator und -repressor während der hematopoetischen Differenzierung wirkt (Ito, 2004; Speck *et al.*, 1999). Unter Einbezug der in dieser Arbeit gewonnenen Daten im Reportergenversuch mit E4orf6 (Abb. 4.31), legt das eine Funktion von E4orf6 in diesem Bereich nahe (vgl. 5.6).

Allerdings konnten in letzter Zeit auch vermehrt Funktionen von Hox Proteinen unabhängig von der Homeodomäne und der Transkription identifiziert werden (Topisirovic *et al.*, 2003; Shiojima *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2000; Hyduk und Percival-Smith, 1996; Rubin *et al.*, 2007). Für HoxB7 z. B. wurde eine mögliche Rolle in der DNA-Reparatur vorgeschlagen. Das Protein kann mit Ku70, Ku80, der katalytischen Untereinheit der DNA-Protein Kinase und poly(ADP) Ribose Polymerase (PARP) interagieren und seine Expression verstärkt die Aktivität der DNA-PK, das Aneinanderfügen von gebrochenen DNA-Strängen (NHEJ) und die DNA-Schadensreparatur in Säugetierzellen (Schild-Poulter *et al.*, 2001; Rubin *et al.*, 2007). Interessanterweise kann auch E4orf6 an die DNA-PK binden und ihre Funktion *in vitro* inhibieren (Boyer *et al.*, 1999; Hart *et al.*, 2005). Die Interaktion beider Proteine könnte also auch mit dieser Funktion begründet sein. Zur Klärung der Frage, warum das virale Protein mit HoxB7 interagiert, müssten aber weitere Versuche durchgeführt und die genauen biologischen Mechanismen der Wirkweise von Hox Proteinen selbst besser aufgeklärt werden.

Eine weitere interessante Frage ist, ob die zwischen E4orf6 gefundene Interaktion mit HoxB7 eine Ausnahme ist, oder ob auch andere Proteine dieser Familie mit dem viralen Protein interagieren. Aufgrund der Zelltyp-spezifischen Expression der verschiedenen Hox Proteine ist z. B. denkbar, dass in unterschiedlichen Zellen oder Geweben verschiedene Hox Proteine mit E4orf6 interagieren. Der Bereich im HoxB7, der in den Hefeklonen gefunden wurde, enthält etwa zwei Drittel des Proteins (Abb. 4.12). Damit sind die DNA-bindende Homeodomäne und das Pentapeptid, welches für die Interaktion mit dem Kofaktor Pbx wichtig ist (Knoepfler und Kamps, 1995; Phelan *et al.*, 1995), enthalten. Diese beiden Sequenzbereiche sind in den verschiedenen Hox Proteinen sehr stark konserviert, wohingegen der Rest weniger Homologien aufweist. Möglicherweise stellen Hox Proteine eine neue Gruppe von Interaktionspartnern dar. Die genaue Identifizierung des Interaktionsbereichs im HoxB7 Protein kann Aufschluss hierüber geben.

Hox Proteine wirken als „biologische Uhren“ (Lawrence *et al.*, 1996) und nachdem für HoxA10 ein direkter Einfluss auf den Zellzyklus beobachtet werden konnte (Bromleigh und Freedman, 2000; Pearson *et al.*, 2005), ist auch für weitere Hox Genprodukte eine Zellzyklusmodulation denkbar. Auch für E4orf6 wird eine mögliche Funktion bei der Zellzyklusregulation über das RXL Motiv in der  $\alpha$ -Helix vermutet (Grifman *et al.*, 1999). Dies sind allerdings nur Spekulationen, die Rolle von Hox Proteinen im Allgemeinen bei der Interaktion mit E4orf6 müsste in weiteren Versuchen genauer untersucht werden. Hierfür muss der Interaktionsbereich sowohl im E4orf6 als auch im HoxB7 oder weiteren Hox Proteinen identifiziert werden.

### 5.3 HoxB7 interagiert mit weiteren viralen Proteinen

Neben E4orf6 interagiert HoxB7 aber auch mit anderen viralen Proteinen während der Infektion. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen konnten, ist das zelluläre Protein in der Lage, mit E1A, E2A und E4orf6/7 zu interagieren (Abb. 4.32, Abb. 4.33 A, B). Dabei fällt jedoch auf, dass in der Infektion keine Bindung an E1A in Anwesenheit von E4orf6 erfolgt. Es ist denkbar, dass in der sehr frühen Phase der Infektion, wenn E1A als einziges virales Protein

in der Zelle vorhanden ist, dieses Protein mit HoxB7 interagiert. Sobald E4orf6 nach etwa sechs Stunden (Boivin *et al.*, 1999) exprimiert ist, könnte HoxB7 präferenziell an dieses virale Genprodukt binden. Durch diese Interaktion wird E4orf6 möglicherweise auf Proteinebene stabilisiert (vgl. 5.2) und die HoxB7-abhängige Transkriptionsaktivierung der viralen Promotoren reguliert (vgl. 5.6).

Auch die Interaktion von E2A und E4orf6/7 mit HoxB7 scheint von anderen viralen Faktoren abzuhängen, da im Wildtypvirus Unterschiede zu den E4orf6- und E1B-55K-negativen Viren auftreten. Die verstärkte Bindung von HoxB7 und E2A im E4orf6-negativen Virus gegenüber dem Wildtypvirus (Abb. 4.33 A) liegt möglicherweise daran, dass das zelluläre Protein im Wildtyp präferenziell mit dem E4orf6 Protein interagiert. Auch bei dem E1B-55K-negativen Virus liegt eine stärkere Bindung vor. Der Grund hierfür ist unklar, eine Interaktion des E1B-55K Proteins mit dem E2A Protein ist bisher nicht bekannt. Die in dieser Arbeit gefundene Interaktion von HoxB7 mit E4orf6/7 *in vitro* (Abb. 4.18) konnte auch während einer Virusinfektion bestätigt werden. Wie bereits für das E1A und E2A Protein beobachtet wurde, erfolgt auch für das E4orf6/7 Protein im Wildtypvirus keine Interaktion mit HoxB7 (Abb. 4.33 B). Eine mögliche Erklärung ist auch hier die präferenzielle Interaktion dieses zellulären Proteins mit E4orf6. Jedoch auch die Bindungsintensitäten der Virusmutanten unterscheiden sich voneinander. Während in Abwesenheit von E4orf6 eine schwache Bindung zu sehen ist, zeigt sich im E1B-55K-negativen Virus eine verstärkte Interaktion von E4orf6/7 mit HoxB7. In einer früheren Studie konnte die Interaktion von E1B-55K mit E4orf6/7 in einem GST-*pull down* Experiment gezeigt werden (Rubenwolf *et al.*, 1997). Daher ist anzunehmen, dass das Vorhandensein von E1B-55K die Bindung von E4orf6/7 an HoxB7 stört, indem es selbst an das virale Protein bindet.

Zur Funktionalität der Interaktion mit E2A und E4orf6/7 wurden in dieser Arbeit keine Analysen durchgeführt, ein Einfluss dieser viralen Faktoren auf die HoxB7 vermittelte Transkriptionsaktivierung der viralen Promotoren ist aber denkbar. In den durchgeführten Experimenten konnten unterschiedliche Ergebnisse in Reportergenversuchen mit E1A alleine und in der Infektion erlangt werden (Abb. 4.28, Abb. 4.29). Die Beobachtung, dass HoxB7 den größten Einfluss auf die Promotoren E1A und E2 zu haben scheint und die Tatsache, dass E1A, E2A und E4orf6/7 an der Regulation dieser und anderer viraler Promotoren beteiligt sind, lässt eine komplexe Regulation der HoxB7-abhängigen transkriptionellen Aktivität der viralen Promotoren durch diese Genprodukte vermuten. Die Herstellung von Virusmutanten, bei denen die einzelnen viralen Proteine nicht mehr mit HoxB7 interagieren können, kann Aufschluss über die Funktionalität der Bindungen liefern.

## 5.4 Veränderte HoxB7 Expression in der Adenovirusinfektion

Wie die Versuche dieser Arbeit zeigen, kommt es im Verlauf der Adenovirusinfektion zu Veränderungen der HoxB7 Expressionsspiegel. Hierbei zeigt sich eine verstärkte Expression ab etwa 24 h nach der Infektion, gefolgt von einer Reduktion ab 48 h (Abb. 4.26 B). Auch die Analyse der HoxB7 mRNA Mengen in E1A-E1B-transformierten Rattennierenzellen ergab eine sechsfache Erhöhung der HoxB7 Expression verglichen mit den primären Zellen (Abb. 4.34). Schein-

bar haben beide Genprodukte auch einen Einfluss auf die Aktivierung des HoxB7-Promotors, wie die Ergebnisse des Reportergenversuchs andeuten (Abb. 4.35). Verglichen mit der Aktivierung des E2*early*-Promotors ist diese Steigerung bei HoxB7 sowie den anderen zellulären Promotoren aber sehr gering. E1A und E4orf6/7 sind virale Transaktivatoren, die virale und zelluläre Promotoren aktivieren können (Jones und Shenk, 1979; Lillie und Green, 1989; Lee *et al.*, 1995; Bandara *et al.*, 1994). Die E1A induzierte Expression viraler aber auch zellulärer Gene erfolgt u. a. durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren E2F und YY1 (Jones und Shenk, 1979; Lillie und Green, 1989; Lee *et al.*, 1995). Auch für die HoxB7-Promotorregion konnte ein YY1-Bindemotiv identifiziert und als funktional befunden werden (Meccia *et al.*, 2003), eine Regulation durch E1A auf diesem Weg ist also denkbar. Dieser Transkriptionsfaktor ist für die späteren Stadien der Embryonalentwicklung der Maus und des Krallenfrosches *Xenopus laevis* entscheidend (Donohoe *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 2004) und auch bei der Tumorgenese von Bedeutung, da er über verschiedene Mechanismen Einfluss auf den Zellzyklus nimmt (Gordon *et al.*, 2006). Eine Regulation von HoxB7 durch YY1 ist also im Einklang mit den Funktionen des Proteins.

Es ist aber auch denkbar, dass E1A oder E4orf6/7 die HoxB7 Expression über den Transkriptionsfaktor E2F regulieren. Das Homolog dieses Transkriptionsfaktors in *Xenopus laevis* induziert die Expression verschiedener Hox Gene, darunter auch HoxB7 (Suzuki und Hemmati-Brivanlou, 2000). Dies könnte die Erhöhung in Anwesenheit von E4orf6/7 erklären.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass ein Einfluss von E1A und E4orf6/7 auf den HoxB7 Promotor vermutlich vorliegt, weitere Untersuchungen, die die Mutation der Binderegionen der entsprechenden Transkriptionsfaktoren beeinhalteten, sollten jedoch durchgeführt werden.

Bereits zuvor konnte gezeigt werden, dass die Expression verschiedener Hox Proteine, hierunter auch HoxB7, durch die Infektion mit CMV verstärkt wird (Wu *et al.*, 2001; Kadota *et al.*, 1992). Es könnte sich bei der Aktivierung von HoxB7 also um einen generellen, von Viren genutzten, Mechanismus handeln. Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, stellt HoxB7 einen positiven Faktor für die Virusinfektion dar (vgl. 5.5), eine Aktivierung der Expression dieses Proteins ist für das Virus also scheinbar von Vorteil.

Nach der anfänglichen Erhöhung der HoxB7 Expression kommt es zu späten Zeitpunkten der Infektion zu einer starken Reduktion der Expressionsspiegel in Wildtyp-infizierten Zellen, aber nicht in Zellen, die mit E1B-55K- oder E4orf6-negativen Viren infiziert wurden (Abb. 4.36). Es könnte sich hierbei um proteasomalen Abbau des zellulären Proteins handeln. Allerdings ist die Reduktion in Zellen, die mit dem E4orf4-negativen Virus infiziert wurden, stärker als in Wildtypvirus-infizierten Zellen. In diesem Virus ist die E4orf6 Expression erhöht, was für einen E4orf6-abhängigen Effekt sprechen könnte. Für den Abbau von Mre11 kann ein solcher Effekt nicht beobachtet werden. Dies und die Ergebnisse der Abbildung 4.26 B deuten darauf hin, dass es sich nicht ausschließlich um einen proteasomalen Effekt handelt, da eine Reduktion der HoxB7 Expression zu späten Zeitpunkten in der Infektion auch in E1B-55K- oder E4orf6 Virusmutanten beobachtet werden kann. Möglicherweise handelt es sich teilweise um den bereits früher beschriebenen Effekt des *host shut-off*, der das weitgehende Abschalten der zellulären Proteinsynthese bezeichnet (Dobner und Kzhyshkowska, 2001; Flint und Gonzalez, 2003). Die Reduktion der HoxB7 Expression zu späteren Zeitpunkten in der Infektion könn-

te aber auch ein indirekter Effekt sein. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit (Abb. 4.25) zeigen, nimmt die Menge von E1A im Wildtypvirus zu späteren Zeitpunkten in der Infektion ab. Da die HoxB7 Expression vermutlich durch E1A aktiviert wird, wird bei verringerter Menge von E1A Proteinen auch HoxB7 weniger stark aktiviert. Die Reduktion der E1A Expression wiederum scheint von E4orf6 beeinflusst zu werden (vgl. 5.6). In Viren ohne funktionelles E4orf6 ist daher länger E1A zu detektieren und damit auch HoxB7 stärker exprimiert. In Viren mit funktionellem E4orf6 dagegen ist zu späteren Zeitpunkten, bedingt durch die negative Regulation durch E4orf6, weniger E1A vorhanden und damit ist die Aktivierung von HoxB7 nicht im selben Maße möglich. In der Virusmutante H5pm4166, die besonders viel E4orf6 exprimiert, ist dieser Effekt noch verstärkt. Zur genauen Analyse der HoxB7 Expression im Verlauf der Virusinfektion müssten aber weitere Versuche durchgeführt werden. Die Inhibierung der zellulären Proteasomen kann Aufschluss geben, ob es sich um einen aktiven Abbau von HoxB7 oder um eine anders verursachte Reduktion handelt.

Wie bereits bezüglich der Interaktion mit E4orf6 stellt sich auch hier die Frage, ob die Modulation der HoxB7 Expression nur für dieses Protein zutrifft oder ob die Expression weiterer Hox Proteine durch Adenoviren beeinflusst wird. Interessanterweise kann in den Promotorbereichen verschiedener Hox Proteine ein- oder mehrmals das YY1-Bindemotiv identifiziert werden (Tab. 5.1). Eine Regulation dieser Hox Proteine durch E1A über YY1 ist also durchaus möglich, in weiterführenden Versuchen müsste der Einfluss von Adenoviren auf die Expression der Proteine aber genauer untersucht werden.

## 5.5 HoxB7 ist ein positiver Regulator der viralen Replikation

In dieser Arbeit konnte HoxB7 als neuer Interaktionspartner der viralen Proteine E4orf6, E1A, E2A und E4orf6/7 identifiziert werden (vgl. 5.2, 5.3). Es war daher von großem Interesse, den Einfluss dieses zellulären Proteins auf die Adenovirusinfektion zu untersuchen. Wie diese Untersuchungen zeigen konnten, ist HoxB7 ein positiver Regulator der viralen Replikation, was bei der sehr stark verminderten Produktion von Nachkommenviren in Abwesenheit des Proteins deutlich wird (Abb. 4.22, Abb. 4.23). Wie die weiteren Experimente zeigen konnten, wirkt HoxB7 sehr früh in der Infektion, da ohne das Protein auch eine verminderte Synthese viraler DNA und mRNA erfolgt (Abb. 4.24). Beide Prozesse könnten zum Teil indirekt durch die ebenfalls geringere Menge früher viraler Proteine (Abb. 4.25) verursacht werden. Allerdings kann durch die hier durchgeführten Versuche auch ein direkter Einfluss von HoxB7 auf die DNA Replikation nicht ausgeschlossen werden. Die reduzierte Synthese früher regulatorischer Proteine zieht eine ebenfalls geringere Produktion später viraler Strukturproteine nach sich (Abb. 4.26 A). Zusammen bewirken die reduzierten Mengen von frühen und späten Proteinen eine deutlich geringere Fähigkeit, infektiöse Virusnachkommen zu produzieren.

Im Gegensatz hierzu kann ein Einfluss von HoxB7 auf die subzelluläre Lokalisation von E1B-55K und E4orf6 weitgehend ausgeschlossen werden (Abb. 4.27). Auch die Assemblierung der E3-Ubiquitin-Ligase wird nicht durch das Fehlen des zellulären Proteins beeinträchtigt (Abb. 4.26 B). Wie die Ergebnisse dieser Arbeit nahelegen, handelt es sich bei der mit E1B-

**Tabelle 5.1: Mögliche YY1-Bindestellen in den Promotorregionen verschiedener Hox Gene.** Angegeben ist der Beginn der YY1-Konsensussequenz CAAT relativ zum Transkriptionsstart (0), wobei davon 5'-gelegene Bereiche durch negative und davon 3'-gelegene Bereiche durch positive Zahlen dargestellt werden. Durch + und - in Klammern ist angegeben, auf welchem DNA Strang das Motiv liegt.

Hox Protein	Position (Strang)
HOXA1	-114(+), -73(+), 27(+), 132(+), 187(+), 95(-), 29(-)
HOXA2	80(+), 114(+)
HOXA3	-119(+), -184(+), -34(+), -11(-), 175(-), 113(-)
HOXA4	-194(+), 52(+), -44(-)
HOXA5	-76(+), -24(+), 132(-), 105(-)
HOXA6	-150(+), -92(+)
HOXA7	-85(+), 30(-)
HOXA9	-127(+), 74(-), -58(-), -167(-)
HOXA10	-153(+), 98(+), 108(-), -16(-)
HOXA11	73(-), -55(-), 80(-), -48(-), -138(+), 122(+)
HOXA13	14(+), 132(-), -109(-)
HOXB1	-182(+), -92(+), 7(-), -90(-)
HOXB2	-66(+), 24(+), 109(+), 119(+)
HOXB3	-83(+), 13(+), 187(-), 3(-), -97(+), -1(+), 151(+), 196(-), -155(-), -194(-), -44(+), -28(-), -136(-)
HOXB4	-72(+), 117(+), 63(-)
HOXB5	-175(+), -70(+), 175(+), 130(-), 103(-)
HOXB6	-173(+), -153(+), -187(-)
HOXB7	-140(+), -57(+)
HOXB8	-33(+)
HOXB9	-117(+), -106(-)
HOXB13	155(+), 185(-), 157(-)
HOXC4	101(+), 68(-), -6(-), -52(-)
HOXC5	-152(+), 74(+), 155(-)
HOXC6	-142(+), -20(+), -16(+), 60(+), 144(+), -158(-), 35(+)
HOXC9	113(+)
HOXC10	-98(+), -85(+), 31(-), -66(-), -180(-)
HOXC11	88(+), -179(-)
HOXC12	185(-), 1(-), -78(-), -150(-), -155(-)
HOXC13	27(-)
HOXD1	19(+), 91(+), 93(-)
HOXD3	-118(+), -17(+), 153(+), -131(-)
HOXD4	32(+), 126(+), 191(-), 146(-), -23(-)
HOXD8	-77(-), -132(-)
HOXD9	165(+), 9(-), -124(-)
HOXD10	-59(+), 197(-)
HOXD11	165(-), -61(-), -172(-)
HOXD12	-192(+), 95(-)
HOXD13	33(+), 86(+), 112(-), 35(-), -193(-)

55K und der Ligase interagierenden Fraktion von E4orf6 um eine andere, als bei der mit HoxB7 assoziierten (vgl. 5.2). Da der effiziente Export der späten viralen mRNAs von einer funktionsfähigen Ligase abhängt (Corbin-Lickfett und Bridge, 2003; Woo und Berk, 2007; Blanchette *et al.*, 2008), ist dieser Mechanismus damit höchstwahrscheinlich auch nicht durch das Fehlen von HoxB7 betroffen, müsste aber zur Beantwortung der Frage untersucht werden. Die beobachtete ineffiziente Produktion von viralen Proteinen und infektiösen Viruspartikeln in Abwesenheit von HoxB7 sind vermutlich die Folgen einer verminderten Transkriptionsaktivierung in der sehr frühen Phase der Infektion, die auf allen Ebenen der Genexpression viraler Produkte sichtbar sind. So konnte gezeigt werden, dass das zelluläre Protein die Transkription der viralen Promotoren in Anwesenheit von E1A aktiviert (Abb. 4.28), wobei sich in dem durchgeführten Reporter-genversuch besonders für die Promotoren E1A und E2 ein starker Effekt zeigt. Dieser Effekt auf transkriptioneller Ebene konnte durch die HoxB7 Bindung an verschiedene virale Promotoren in einem Chromatin-Immunpräzipitations Experiment bestätigt werden (Abb. 4.30). Hier konnte eine Interaktion des Transkriptionsfaktors mit der DNA der Promotoren E1A und E2 *early*, darüber hinaus aber auch des E1B-Promotors beobachtet werden. Für letzteren konnte kein signifikanter Effekt auf transkriptioneller Ebene gefunden werden, aber eine Bindung muss nicht zwangsläufig eine nachfolgende Aktivierung mit sich bringen.

Im Promotorbereich des E1A Proteins liegen mehrere, für die Aktivierung des Gens, wichtige Sequenzabschnitte, darunter ein *Enhancer* Element (Hearing und Shenk, 1983). Die Identität der für die Aktivierung entscheidenden zellulären Transkriptionsfaktoren wurde bislang aber nicht vollständig aufgedeckt (Berk, 1986). Möglicherweise handelt es sich bei einem dieser zellulären Transkriptionsfaktoren um HoxB7.

Nachdem das E1A Protein als erstes virales Genprodukt exprimiert ist, ist denkbar, dass in dieser sehr frühen Phase der Infektion eine Interaktion mit HoxB7 erfolgt, welche die Aktivierung der weiteren frühen viralen Promotoren bewirkt. Die in dieser Arbeit aufgedeckte Bindung von HoxB7 an E1A sowohl in der Transfektion als auch in der Infektion in Abwesenheit von E4orf6 (Abb. 4.32) sowie der Reporter-genversuch (Abb. 4.28) bestätigen diese Theorie. Nachdem weitere virale Proteine im Verlauf der Infektion exprimiert werden, verändern sich möglicherweise die Interaktionen von HoxB7 und damit die transkriptionelle Aktivität des Proteins. Bei der Analyse der Bindung von HoxB7 an die viralen Promotoren nach Infektion des E4orf6-negativen Virus ist auffällig, dass das zelluläre Protein in Abwesenheit von E4orf6 in der Lage ist, deutlich besser an den E1A-Promotor zu binden (Abb. 4.30). Gleiches gilt für die Promotoren E1B und pIX. In der Wildtypvirus Infektion ist dagegen keine Bindung von HoxB7 an den pIX-Promotor zu sehen. Da, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen konnten, eine Interaktion zwischen HoxB7 und E4orf6 in der Infektion erfolgt (vgl. 5.2), ist eine Modulation von HoxB7 durch das virale Protein denkbar. Wenn in der Infektion nach etwa sechs Stunden das E4orf6 Protein exprimiert ist (Boivin *et al.*, 1999), könnte es z. B. die Expression von E1A negativ beeinflussen. Auf die mögliche transkriptionelle Regulation durch E4orf6 wird in 5.6 genauer eingegangen.

Neben der Bindung an E4orf6 wurde in dieser Arbeit auch eine Interaktion von HoxB7 mit E2A und E4orf6/7 identifiziert (Abb. 4.33), wobei die jeweiligen Interaktionen durch ver-

schiedene, bisher nicht näher analysierte, Wechselwirkungen mit anderen viralen Proteinen beeinflusst werden. Nach Expression dieser Proteine im Verlauf der Infektion könnte es nun nicht mehr zur Bindung an E1A sondern verstärkt an die Proteine E2A und E4orf6/7 kommen (vgl. 5.3). Dies könnte möglicherweise ebenfalls eine veränderte Aktivität von HoxB7 zur Folge haben. Der für fast alle Promotoren beobachtete leichte Anstieg der Promotoraktivität durch Abwesenheit von HoxB7 in der späteren Phase der Infektion (Abb. 4.29) bekräftigt diese Vermutung. Es ist bekannt, dass die gewebsspezifischen und zeitabhängigen Funktionen der verschiedenen Hox Proteine durch die Interaktion mit unterschiedlichen Kofaktoren reguliert werden (Knoepfler und Kamps, 1995; Phelan *et al.*, 1995; Chauvet *et al.*, 2000; Ch'ng und Kenyon, 1999). Ob es sich bei den viralen Proteinen um Kofaktoren, die die HoxB7 Aktivität verändern, handelt, müsste in weiterführenden Versuchen analysiert werden.

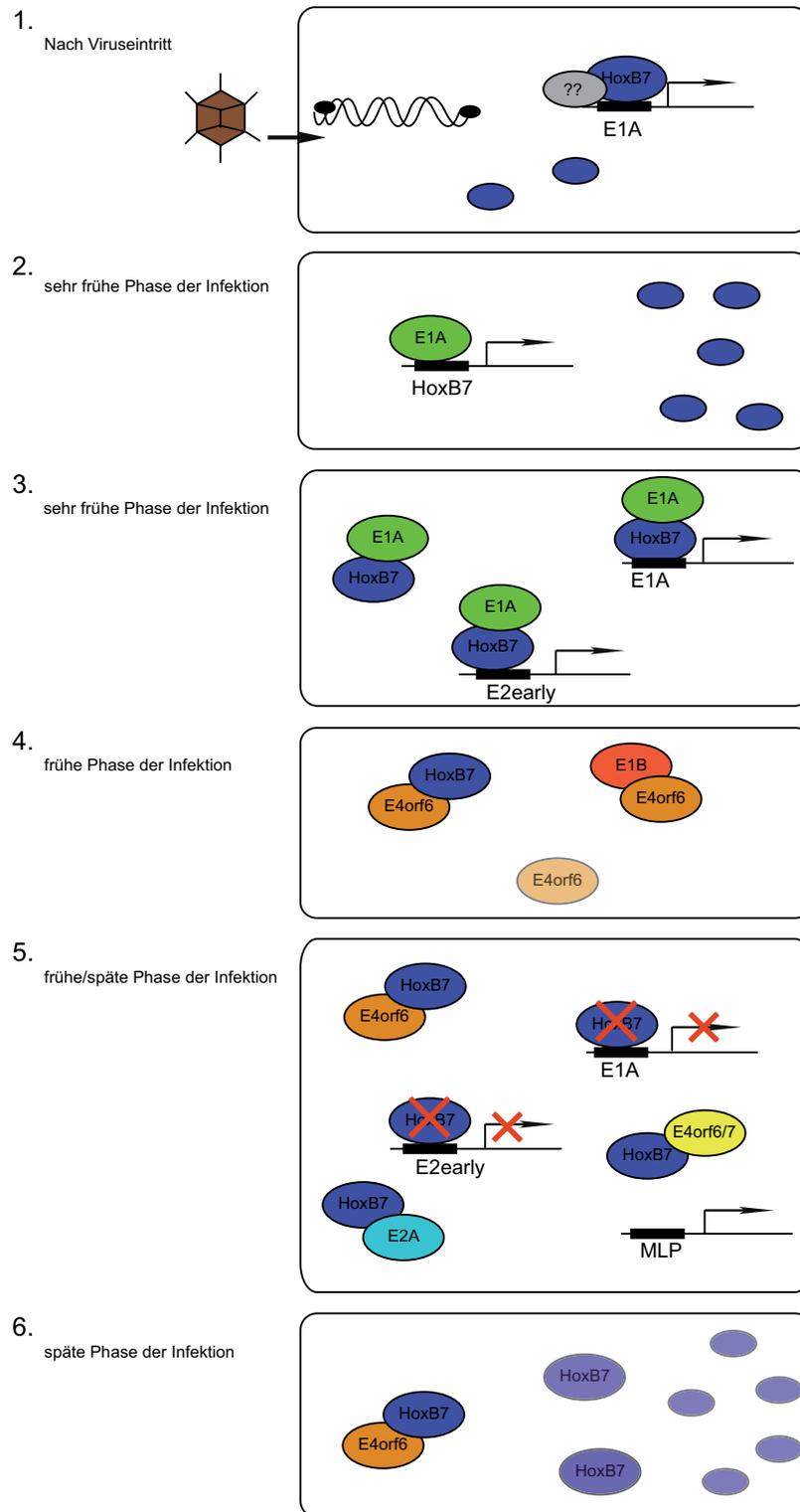
Es ist anzunehmen, dass die HoxB7-abhängige Initiierung der Expression viraler Promotoren früh in der Infektion von entscheidenderer Bedeutung ist als die bisher nicht näher identifizierten Funktionen zu späten Zeitpunkten. Während die Reduktion von HoxB7 einen sehr starken negativen Effekt auf die Promotoraktivität früh in der Infektion hat, zieht sie dagegen zu späten Zeitpunkten nur eine leichte Erhöhung derselben nach sich.

Neben der fehlenden Aktivierung der frühen viralen Promotoren ist der beobachtete Defekt in der Virusnachkommenproduktion (Abb. 4.22, Abb. 4.23) in Abwesenheit von HoxB7 höchstwahrscheinlich auch auf die bereits vorher diskutierte fehlende Stabilisierung von E4orf6 zurückzuführen (vgl. 5.2).

Ein Einfluss von Hox Proteinen auf den viralen Lebenszyklus konnte bereits für andere Viren gezeigt werden. So kann die verstärkte Expression von HoxA5 im Mausmodell die Replikation des Herpes-Simplex Virus-1 deutlich steigern, was zu einer starken Keratitis der infizierten Tiere führt (Kadota *et al.*, 1992; Galle *et al.*, 2001; Mitchell *et al.*, 1993).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass bedingt durch das Fehlen von HoxB7 in der sehr frühen Phase der Infektion die Aktivierung der viralen Promotoren vermutlich nicht effizient ist. Dies führt höchstwahrscheinlich zu einer verminderten Produktion von frühen und späten viralen Proteinen und daher auch zu einer geringeren Produktion von Nachkommenviren. Um einen genaueren Einblick in die Mechanismen der HoxB7-vermittelten Transkriptionsregulation während der Virusinfektion zu erlangen, müssen allerdings weitere Versuche durchgeführt werden. Hierbei ist anzumerken, dass bisher ein indirekter, durch das Fehlen von HoxB7 verursachter, Effekt nicht ausgeschlossen werden kann.

Unter Einbezug der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bezüglich der Interaktionen von HoxB7 mit E4orf6, E1A, E2A und E4orf6/7 sowie der Untersuchungen zur Funktionalität dieser Interaktionen, kann ein Modell der HoxB7 Funktionen im Verlauf der Virusinfektion aufgestellt werden (Abb. 5.1).



**Abbildung 5.1: Schema zur Funktion von HoxB7 in der adenoviralen Infektion.** Dar- gestellt sind die vermuteten Funktionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Infektionsverlauf. Eine Erklärung ist dem Text zu entnehmen.

## 5.6 E4orf6 als potentieller Transkriptionsregulator

Der Anteil des während der Infektion in der Zelle exprimierten E1B-55K, der mit E4orf6 und dem Ligasekomplex interagiert, beträgt mehr als 95% und das E1B-55K Protein erhält seine Funktionen hauptsächlich durch diese Interaktion (Woo und Berk, 2007; Harada *et al.*, 2002). Anders ist dies bei dem E4orf6 Protein, von dem in der Infektion maximal 50% mit E1B-55K assoziiert sind (Cutt *et al.*, 1987; Ornelles und Shenk, 1991; Smiley *et al.*, 1990). Es wird daher angenommen, dass unterschiedliche funktionelle Formen von E4orf6 existieren (Rubenwolf *et al.*, 1997), welche durch die Interaktion mit verschiedenen zellulären Interaktionspartnern ermöglicht werden. So ist auch, wie die Untersuchung von verschiedenen E4orf6 Mutanten zeigen konnte, die Fähigkeit von E4orf6, die Relokalisation von E1B-55K in den Zellkern zu gewährleisten, von der Fähigkeit, eine produktive Infektion zu unterstützen, unabhängig (Orlando und Ornelles, 2002). Eine weitere lange bekannte, von E1B-55K-unabhängige, Funktion von E4orf6 ist darüber hinaus die Regulation des Spleißens der späten viralen RNAs sowie ihre Stabilisierung im Zellkern (Nordqvist *et al.*, 1994; Öhman *et al.*, 1993; Imperiale *et al.*, 1995). Darüber hinaus ist E4orf6 unabhängig von E1B-55K in der Lage, mit p53 zu interagieren und das zelluläre Protein zu inaktivieren (Dobner *et al.*, 1996).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Fraktion von E4orf6, die nicht mit E1B-55K und dem Ligasekomplex assoziiert ist, mit HoxB7 interagiert (vgl. 5.2). Wie weiterhin gezeigt werden konnte, beeinflusst die Expression von E4orf6 die Aktivität der viralen Promotoren E1A, E2late, pIX und MLP (Abb. 4.31). Dabei kommt es bei den Promotoren E1A und E2late zu einer Reduktion, bei den Promotoren pIX und MLP zu einer verstärkten Aktivität in Anwesenheit des viralen Proteins. Damit scheint E4orf6 die Transkription der frühen viralen Promotoren zu reprimieren, während es die der späten teilweise fördert. Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Proteine der E4-Region für den Übergang von der frühen zur späten Phase der Infektion nötig sind (Nordqvist *et al.*, 1994). Es ist denkbar, dass ein Einfluss von E4orf6 durch die Regulation der Transkription vorliegt. Möglicherweise verhindert die Interaktion von E4orf6 mit HoxB7 dessen Bindung an E1A, was die Aktivierung der frühen viralen Promotoren verhindert und damit deren Abschalten bewirkt.

Die E4orf6-abhängige Regulation der Transkription viraler RNAs erfolgt scheinbar zumindest teilweise durch die Beeinflussung der Bindung von HoxB7 an die Promotorregionen der frühen viralen Transkriptionseinheiten, wie die Ergebnisse der Chromatin-Immunpräzipitation nahelegen (Abb. 4.30). Auf die Bindung von HoxB7 an den E1A-Promotor hat E4orf6 dabei einen negativen Effekt, wodurch auch dessen Aktivität negativ beeinflusst wird (Abb. 4.31). Dies wird weiterhin bei der Analyse der mRNA (Abb. 4.24) und Proteinsynthese beobachtet (Abb. 4.25). Die Vermutung, dass E4orf6 einen negativen Einfluss auf die E1A Expression hat, wird durch die Ergebnisse früherer Versuche bezüglich des Vergleichs der E1A Proteinmenge in BRK Zellen untermauert. Dabei konnte in ABS Zellen, die die viralen Proteine E1A, E1B-55K und E4orf6 exprimieren, weniger E1A Protein als in AB Zellen, welche nur E1A und E1B-55K enthalten, detektiert werden. Eine Erklärung hierfür konnte nicht gefunden werden (Nevels *et al.*, 1999a).

Eine weitere Beobachtung, die für eine Rolle von E4orf6 in der Transkriptionskontrolle spre-

chen könnten, ist die anhand von Computermodellen errechnete Tertiärstruktur von E4orf6. Die Anordnung von möglicherweise Zink-bindenden Aminosäuren in dem viralen Protein, ähnelt dem Zink-bindenden Element des Transkriptionsaktivators Gal4 der Hefe (Flint und Gonzalez, 2003). Darüber hinaus konnte kürzlich ein Einfluss von E4orf6 auf die Transaktivierung des humanen Parovirus B19 in Endothelzellen beobachtet werden. Die Autoren gehen hierbei von einer neuen, bisher nicht näher charakterisierten, Funktion des E4orf6 Proteins aus, da die Transaktivierung hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene stattfand (Pozzuto *et al.*, 2011). Auch die Funktionen der im Hefe-Zwei-Hybrid Experiment gefundenen E4orf6 Interaktionspartner sowie eines weiteren funktionell mit E4orf6 verbundenen Proteins, RUNX-1, im RNA Metabolismus und der Transkription lassen einen Einfluss von E4orf6 hierbei vermuten (Thebault *et al.*, 2000; Gautier *et al.*, 2005; Al-Maghrebi *et al.*, 2002; Corbi *et al.*, 2010; Ito, 2004; Speck *et al.*, 1999; Marshall *et al.*, 2008).

Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Arbeit damit eine neue Funktion des E4orf6 Proteins an, zur Identifizierung der Rolle dieses viralen Proteins bei der Regulation der Transkription sind aber weitere Untersuchungen nötig.

## 5.7 Einfluss von HoxB7 und PML in der Adenovirus-vermittelten Transformation

Die Funktionen der adenoviralen Proteine in der Transformation beruhen auf deren Wechselwirkung mit unterschiedlichen Interaktionspartnern zur Modulation zellulärer Mechanismen in der produktiven Infektion. Dabei führen die Interaktionen von E1A mit wichtigen regulatorischen Proteinen wie z. B. pRB zur Aktivierung von zellulären Genen, die die Zellzyklusprogression vorantreiben (Cress und Nevins, 1996b; Frisch und Mymryk, 2002; Ferrari *et al.*, 2008, 2009). Die zusätzliche Expression von E1B-55K bewirkt durch Inaktivierung von p53 (Sarnow *et al.*, 1982a; Kao *et al.*, 1990; Yew *et al.*, 1994; Martin und Berk, 1998, 1999; Endter *et al.*, 2001, 2005) eine vollständige Transformation (van der Eb und Zantema, 1992). Allerdings trägt auch die Modulation der Proteine Mre11, Daxx und PML durch das virale Protein zur Transformation der Zellen bei (Härtl *et al.*, 2008; Sieber und Dobner, 2007; Schreiner *et al.*, 2010; Wimmer *et al.*, 2010a). Wie mehrere Studien der letzten Jahre zeigen konnten, besitzt das E4orf6 Protein die Fähigkeit diese durch E1A und E1B-55K induzierte Transformation zu verstärken. Die so transformierten Zellen gewinnen zusätzliche, mit onkogener Transformation assoziierte, Eigenschaften (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1999a,b). Hierbei wurde die Onkodomäne im E4orf6 Protein als ausreichend für die Verstärkung der Transformation identifiziert (Nevels *et al.*, 2000).

Aufgrund der in dieser Arbeit aufgedeckten Interaktion mit der Onkodomäne von E4orf6 (vgl. 4.2, 4.7) könnten sowohl HoxB7 als auch PML an der E4orf6-vermittelten verstärkten Transformation primärer Rattenzellen beteiligt sein. Darüber hinaus sind beide Proteine in die Tumorentstehung involviert.

So gibt es zahlreiche Hinweise für eine wichtige Rolle von Hox Proteinen bei der Tumorentstehung. Auch für HoxB7 wird eine Rolle bei der Entstehung von Melanomen sowie Brust-

und Eierstockkrebs diskutiert (vgl. 1.3). Dabei fällt es jedoch zunächst schwer, die normalen Funktionen der Hox Proteine in der Emryogenese mit ihrer Rolle bei der Tumorentstehung in Einklang zu bringen. Allerdings scheint ein enger Zusammenhang zwischen Tumorgenese und Embryogenese zu existieren, da die Charakteristika von Tumor- und embryonalen Zellen wie die Fähigkeit der Zellmigration, Invasion und verstärkte Mitoseraten überlappen (Maulbecker und Gruss, 1993; Salomon und Lewis, 2004).

In den Tumorzellen zeigen die Hox Proteine eine veränderte Expression gegenüber den Ausgangszellen, aber bislang ist nicht zweifelsfrei geklärt, ob dies der Auslöser oder nur eine Folge der Transformation ist (Abate-Shen, 2002). HoxB7 scheint durch die miRNA-196a in normalen Zellen weitgehend reprimiert zu werden, während das Protein in Melanomen durch Fehlen der Repression stark exprimiert wird (Braig *et al.*, 2010). Auch in Tumorzelllinien und primären Tumoren anderer Gewebe ist das Protein verstärkt exprimiert (Care *et al.*, 1996; Naora *et al.*, 2001). Interessanterweise konnte auch in dieser Arbeit in mit adenoviralen Onkogenen transformierten Rattenzellen eine, gegenüber den primären Zellen, erhöhte Expression identifiziert werden (Abb. 4.34). Diese wird vermutlich durch die Induktion der HoxB7 Expression durch E1A ausgelöst (vgl. 5.4). Darüber hinaus konnte der in dieser Arbeit gefundene Einfluss von HoxB7 auf die virale Infektion (vgl. 5.5) auch für die Transformation teilweise bestätigt werden (Abb. 4.19). Dabei kann der mit HoxB7 interagierende Bereich im E4orf6 Protein auf die Aminosäuren 224 bis 248 eingegrenzt werden, da nur in dieser Deletionsmutante eine Reduktion der *Focus* Zahl zu sehen ist. Allerdings umfasst dieser Abschnitt des viralen Proteins die amphipatische  $\alpha$ -Helix. Der Verlust der Funktion dieses E4orf6 Proteins könnte durch die Deletion der Helix und einer vollständig veränderten Struktur des Proteins erklärt werden.

Entgegen den Angaben in der Literatur (Maulbecker und Gruss, 1993) zeigt HoxB7 alleine hier jedoch kein transformierendes Potential. Eine mögliche Ursache könnten unterschiedliche Versuchsbedingungen sein, da in dem beschriebenen Experiment nicht Ratten- sondern Mauszellen verwendet wurden, die bereits „vortransformiert“ sind. Das bedeutet, dass ein zusätzliches Onkogen die Zellen sehr stark transformieren kann. In dieser Studie zeigte sich darüber hinaus ein Unterschied der Transformationseffizienz von HoxB7 verglichen mit dem SV40 *large* T-Antigen, welches in der Lage ist, die Zellen deutlich besser zu transformieren. Interessanterweise zeigt sich in dem in dieser Arbeit durchgeführten Transformationsexperiment eine Reduktion der Zahl transformierter Zellen durch die Koexpression von HoxB7 mit den adenoviralen Onkogenen in allen Ansätzen (Abb. 4.19). Eine im Verlauf der Embryonalentwicklung veränderte Expression von HoxB7 in der Niere und ein Einfluss auf die Etablierung der Strukturen dieses Organs hierdurch sind bekannt (Argao *et al.*, 1995). Auch in adulten humanen Nierenzellen ist HoxB7 exprimiert (Cillo *et al.*, 1992). Für manche Hox Proteine konnte eine veränderte Expression in Nierentumoren im Vergleich zu den Ursprungszellen gefunden werden, dabei erfolgt für manche ein verstärkte, für andere eine verminderte Expression (Cillo *et al.*, 1992). Leider gibt es keine Angaben, ob es eine Veränderung der HoxB7 Expression in Tumoren dieses Organs gibt. Auch für die Expression in Rattenzellen liegen keine genaueren Daten bezüglich der HoxB7 Expressionsspiegel vor.

Durch die verstärkte Expression von HoxB7 in den transformierten Rattenzellen in dieser Arbeit ist eine vermehrte Interaktion des zellulären Proteins mit E1A denkbar, welche mög-

licherweise die Funktion von E1A beeinträchtigt. Allerdings steht die vorher beschriebene Induktion der HoxB7 Expression durch E1A im Widerspruch zu der beobachteten Reduktion der Zahl transformierter Zellen, die molekulare Grundlage dieser Beobachtung sollte daher in weiteren Versuchen untersucht werden. Ebenso sollte ein Einfluss weiterer Hox Proteine auf die Transformation durch adenovirale Onkogene untersucht werden, da möglicherweise das Expressionsmuster der verschiedenen Proteine insgesamt eine Rolle für die Transformation spielt.

Aber auch die Rolle von PML bei der E4orf6-vermittelten Transformation wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit deutlich. Die Beobachtung, dass E4orf6 Punktmutanten, die eine reduzierte Bindung an PML aufweisen, eine reduzierte Zahl transformierter Zellen hervorbringen (Abb. 4.40), spricht für eine Abhängigkeit der Transformation von diesem zellulären Protein. PML Proteine spielen bei der Tumorgenese eine Rolle, da sie als Tumorsuppressor wirken und in verschiedenen Tumoren fehlreguliert sind (Koken *et al.*, 1995; Salomoni und Pandolfi, 2002; Gurrieri *et al.*, 2004a,b; Scaglioni *et al.*, 2006; Salomoni *et al.*, 2008; Ruggero *et al.*, 2000). Weiterhin sind sie die Hauptkomponenten der PML-NBs, an denen weitere wichtige Tumorsuppressor Proteine lokalisieren (Pearson *et al.*, 2000; van Damme *et al.*, 2010).

Interessanterweise zeigt ein Vergleich der E4orf6 Proteine verschiedener Adenovirustypen weitgehende Übereinstimmungen der vermutlich mit HoxB7 und PML interagierenden Aminosäuren (Abb. 5.2). Die Einführung von Punktmutationen an hoch konservierten Aminosäurepositionen im Bereich der Aminosäuren 224 bis 248 könnte genaueren Einblick in den HoxB7 Interaktionsbereich liefern. Auch die Mutation der Aminosäure 289, die in den verschiedenen Adenoviren sehr hoch konserviert ist, zusammen mit den Mutationen an Position 288 und 290 könnte einen vollständigen Verlust der Bindung an PML verursachen. Diese E4orf6 Mutanten sollten erneut in Transformationsexperimenten untersucht werden.



**Abbildung 5.2: Vergleich der E4orf6 Proteinsequenz verschiedener Adenoviren.** Konservierte Aminosäuren sind entsprechend ihrer prozentualen Übereinstimmung farblich unterlegt (aus Cheng *et al.*, 2011). Die möglichen, mit HoxB7 und PML interagierenden, Bereiche sind dargestellt, die Positionsangaben beziehen sich hierbei auf die Aminosäuren des HAdV5.

Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass sowohl HoxB7 als auch PML eine wichtige Rolle bei der Adenovirus-vermittelten Transformation spielen, aber auch ein Einfluss anderer, bisher unbekannter E4orf6 Interaktionspartner ist denkbar. Die Daten liefern damit die Grundlage für weitere Untersuchungen zur Aufklärung der Mechanismen der viralen Transformation und Onkogenese.

---

# Literaturverzeichnis

- [Abate-Shen 2002] ABATE-SHEN, C.: Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? In: *Nat Rev Cancer* 2 (2002), S. 777–785
- [Abe *et al.* 2003] ABE, S. ; MIYAMURA, K. ; OBA, T. ; TERAKURA, S. ; KASAI, M. ; KITAORI, K. ; SASAKI, T. ; KODERA, Y.: Oral ribavirin for severe adenovirus infection after allogeneic marrow transplantation. In: *Bone Marrow Transplant* 32 (2003), S. 1107–1108
- [Al-Maghrebi *et al.* 2002] AL-MAGHREBI, M. ; BRULE, H. ; PADKINA, M. ; ALLEN, C. ; HOLMES, W. M. ; ZEHNER, Z. E.: The 3' untranslated region of human vimentin mRNA interacts with protein complexes containing eEF-1gamma and HAX-1. In: *Nucleic Acids Res* 30 (2002), S. 5017–5028
- [Allard *et al.* 1992] ALLARD, A. ; ALBINSSON, B. ; WADELL, G.: Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. In: *J Med Virol* 37 (1992), S. 149–157
- [Alter *et al.* 1989] ALTER, H. J. ; PURCELL, R. H. ; SHIH, J. W. ; MELPOLDER, J. C. ; HOUGHTON, M. ; CHOO, Q. L. ; KUO, G.: Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. In: *N Engl J Med* 321 (1989), S. 1494–1500
- [Ankerst und Jonsson 1989] ANKERST, J. ; JONSSON, N.: Adenovirus type 9-induced tumorigenesis in the rat mammary gland related to sex hormonal state. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 81 (1989), S. 294–298
- [Araujo *et al.* 2005] ARAUJO, F. D. ; STRACKER, T. H. ; CARSON, C. T. ; LEE, D. V. ; WEITZMAN, M. D.: Adenovirus type 5 E4orf3 protein targets the Mre11 complex to cytoplasmic aggresomes. In: *J Virol* 79 (2005), S. 11382–11391
- [Argao *et al.* 1995] ARGAO, E. A. ; KERN, M. J. ; BRANFORD, W. W. ; SCOTT JR., W. J. ; POTTER, S. S.: Malformations of the heart, kidney, palate, and skeleton in alpha-MHC-Hoxb-7 transgenic mice. In: *Mech Dev* 52 (1995), S. 291–303
- [Atkinson *et al.* 2005] ATKINSON, R. L. ; DHURANDHAR, N. V. ; ALLISON, D. B. ; BOWEN, R. L. ; ISRAEL, B. A. ; ALBU, J. B. ; AUGUSTUS, A. S.: Human adenovirus-36 is associated with increased body weight and paradoxical reduction of serum lipids. In: *Int J Obes (Lond)* 29 (2005), S. 281–286
- [Averof und Akam 1995] AVEROF, M. ; AKAM, M.: Hox genes and the diversification of insect and crustacean body plans. In: *Nature* 376 (1995), S. 420–423
- [Averof und Patel 1997] AVEROF, M. ; PATEL, N. H.: Crustacean appendage evolution associated with changes in Hox gene expression. In: *Nature* 388 (1997), S. 682–686
- [Babich *et al.* 1983] BABICH, A. ; FELDMAN, L. T. ; NEVINS, J. R. ; DARNELL JR., J. E. ; WEINBERGER, C.: Effect of adenovirus on metabolism of specific host mRNAs: transport control and specific translational discrimination. In: *Mol Cell Biol* 3 (1983), S. 1212–1221
- [Babiss *et al.* 1985] BABISS, L. E. ; GINSBERG, H. S. ; DARNELL JR., J. E.: Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport. In: *Mol Cell Biol* 5 (1985), S. 2552–2558

- 
- [Bailey und Mautner 1994] BAILEY, A. ; MAUTNER, V.: Phylogenetic relationships among adenovirus serotypes. In: *Virology* 205 (1994), S. 438–452
- [Baker *et al.* 2007] BAKER, A. ; ROHLEDER, K. J. ; HANAKAHI, L. A. ; KETNER, G.: Adenovirus E4 34k and E1b 55k oncoproteins target host DNA ligase IV for proteasomal degradation. In: *J Virol* 81 (2007), S. 7034–7040
- [Bandara *et al.* 1994] BANDARA, L. R. ; LAM, E. W. ; SORESENSEN, T. S. ; ZAMANIAN, M. ; GIRLING, R. ; LA THANGUE, N. B.: DP-1: a cell cycle-regulated and phosphorylated component of transcription factor DRTF1/E2F which is functionally important for recognition by pRb and the adenovirus E4 orf 6/7 protein. In: *Embo J* 13 (1994), S. 3104–3114
- [Baur *et al.* 1997] BAUR, A. S. ; SASS, G. ; LAFFERT, B. ; WILLBOLD, D. ; CHENG-MAYER, C. ; PETERLIN, B. M.: The N-terminus of Nef from HIV-1/SIV associates with a protein complex containing Lck and a serine kinase. In: *Immunity* 6 (1997), S. 283–291
- [Beck *et al.* 1993] BECK, K. F. ; STATHOPOULOS, I. ; BERNINGER, M. G. ; SCHWEIZER, M.: Overcoming GC compression in nucleotide sequencing. In: *Biotechniques* 14 (1993), S. 375
- [Bell *et al.* 2000] BELL, P. ; LIEBERMAN, P. M. ; MAUL, G. G.: Lytic but not latent replication of epstein-barr virus is associated with PML and induces sequential release of nuclear domain 10 proteins. In: *J Virol* 74 (2000), S. 11800–11810
- [Beltz und Flint 1979] BELTZ, G. A. ; FLINT, S. J.: Inhibition of HeLa cell protein synthesis during adenovirus infection: restriction of cellular messenger RNA sequences to the nucleus. In: *J Mol Biol* 131 (1979), S. 353–373
- [Benko 2000] BENKO, M.: Comparison of the genome of ovine adenovirus types 1 through 5 by restriction enzyme analysis and DNA hybridisation. In: *Acta Vet Hung* 48 (2000), S. 477–484
- [Bergelson *et al.* 1997] BERGELSON, J. M. ; CUNNINGHAM, J. A. ; DROGUETT, G. ; KURT-JONES, E. A. ; KRITHIVAS, A. ; HONG, J. S. ; HORWITZ, M. S. ; CROWELL, R. L. ; FINBERG, R. W.: Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. In: *Science* 275 (1997), S. 1320–1323
- [Berk 1986] BERK, A. J.: Adenovirus promoters and E1A transactivation. In: *Annu Rev Genet* 20 (1986), S. 45–79
- [Berk 2005] BERK, A. J.: Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. In: *Oncogene* 24 (2005), S. 7673–7685
- [Bernardi und Pandolfi 2007] BERNARDI, R. ; PANDOLFI, P. P.: Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (2007), S. 1006–1016
- [Best *et al.* 2002] BEST, J. L. ; GANIATSAS, S. ; AGARWAL, S. ; CHANGOU, A. ; SALOMONI, P. ; SHIRIHAI, O. ; MELUH, P. B. ; PANDOLFI, P. P. ; ZON, L. I.: SUMO-1 protease-1 regulates gene transcription through PML. In: *Mol Cell* 10 (2002), S. 843–855
- [Beyer *et al.* 2002] BEYER, W. R. ; WESTPHAL, M. ; OSTERTAG, W. ; VON LAER, D.: Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range. In: *J Virol* 76 (2002), S. 1488–1495
- [Bittner 1936] BITTNER, J. J.: Some Possible Effects of Nursing on the Mammary Gland Tumor Incidence in Mice. In: *Science* 84 (1936), S. 162
- [Blais und Dynlacht 2004] BLAIS, A. ; DYNLACHT, B. D.: Hitting their targets: an emerging picture of E2F and cell cycle control. In: *Curr Opin Genet Dev* 14 (2004), S. 527–532
- [Blanchette *et al.* 2004] BLANCHETTE, P. ; CHENG, C. Y. ; YAN, Q. ; KETNER, G. ; ORNELLES, D. A. ; DOBNER, T. ; CONAWAY, R. C. ; CONAWAY, J. W. ; BRANTON, P. E.: Both BC-box motifs of adenovirus protein E4orf6 are required to efficiently assemble an E3 ligase complex that degrades p53. In: *Mol Cell Biol* 24 (2004), S. 9619–9629
-

- 
- [Blanchette *et al.* 2008] BLANCHETTE, P. ; KINDSMÜLLER, K. ; GROITL, P. ; DALLAIRE, F. ; SPEISEDER, T. ; BRANTON, P. E. ; DOBNER, T.: Control of mRNA export by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins during productive infection requires E4orf6 ubiquitin ligase activity. In: *J Virol* 82 (2008), S. 2642–2651
- [Blumberg *et al.* 1975] BLUMBERG, B. S. ; LAROUZE, B. ; LONDON, W. T. ; WERNER, B. ; HESSER, J. E. ; MILLMAN, I. ; SAIMOT, G. ; PAYET, M.: The relation of infection with the hepatitis B agent to primary hepatic carcinoma. In: *Am J Pathol* 81 (1975), S. 669–682
- [Boisvert *et al.* 2000] BOISVERT, F. M. ; HENDZEL, M. J. ; BAZETT-JONES, D. P.: Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. In: *J Cell Biol* 148 (2000), S. 283–292
- [Boivin *et al.* 1999] BOIVIN, D. ; MORRISON, M. R. ; MARCELLUS, R. C. ; QUERIDO, E. ; BRANTON, P. E.: 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. In: *J Virol* 73 (1999), S. 1245–1253
- [Borden 2002] BORDEN, K. L.: Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. In: *Mol Cell Biol* 22 (2002), S. 5259–5269
- [Borden *et al.* 1998] BORDEN, K. L. ; CAMPBELL DWYER, E. J. ; SALVATO, M. S.: An arenavirus RING (zinc-binding) protein binds the oncoprotein promyelocyte leukemia protein (PML) and relocates PML nuclear bodies to the cytoplasm. In: *J Virol* 72 (1998), S. 758–766
- [Boshart *et al.* 1984] BOSHART, M. ; GISSMANN, L. ; IKENBERG, H. ; KLEINHEINZ, A. ; SCHEURLEN, W. ; ZUR HAUSEN, H.: A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. In: *Embo J* 3 (1984), S. 1151–1157
- [Boudreau *et al.* 1997] BOUDREAU, N. ; ANDREWS, C. ; SREBROW, A. ; RAVANPAY, A. ; CHERESH, D. A.: Induction of the angiogenic phenotype by Hox D3. In: *J Cell Biol* 139 (1997), S. 257–264
- [Bourbon *et al.* 1995] BOURBON, H. M. ; MARTIN-BLANCO, E. ; ROSEN, D. ; KORNBERG, T. B.: Phosphorylation of the *Drosophila* engrailed protein at a site outside its homeodomain enhances DNA binding. In: *J Biol Chem* 270 (1995), S. 11130–11139
- [Boyer und Ketner 2000] BOYER, J. L. ; KETNER, G.: Genetic analysis of a potential zinc-binding domain of the adenovirus E4 34k protein. In: *J Biol Chem* 275 (2000), S. 14969–14978
- [Boyer *et al.* 1999] BOYER, J. L. ; ROHLEDER, K. ; KETNER, G.: Adenovirus E4 34k and E4 11k inhibit double strand break repair and are physically associated with the cellular DNA-dependent protein kinase. In: *Virology* 263 (1999), S. 307–312
- [Bradford 1976] BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal Biochem* 72 (1976), S. 248–254
- [Braig *et al.* 2010] BRAIG, S. ; MUELLER, D. W. ; ROTHHAMMER, T. ; BOSSERHOFF, A. K.: MicroRNA miR-196a is a central regulator of HOX-B7 and BMP4 expression in malignant melanoma. In: *Cell Mol Life Sci* 67 (2010), S. 3535–3548
- [Branton *et al.* 1985] BRANTON, P. E. ; BAYLEY, S. T. ; GRAHAM, F. L.: Transformation by human adenoviruses. In: *Biochim Biophys Acta* 780 (1985), S. 67–94
- [Bridge und Ketner 1990] BRIDGE, E. ; KETNER, G.: Interaction of adenoviral E4 and E1b products in late gene expression. In: *Virology* 174 (1990), S. 345–353
- [Bromleigh und Freedman 2000] BROMLEIGH, V. C. ; FREEDMAN, L. P.: p21 is a transcriptional target of HOXA10 in differentiating myelomonocytic cells. In: *Genes Dev* 14 (2000), S. 2581–2586
- [Brown *et al.* 2001] BROWN, L. M. ; GONZALEZ, R. A. ; NOVOTNY, J. ; FLINT, S. J.: Structure of the adenovirus E4 Orf6 protein predicted by fold recognition and comparative protein modeling. In: *Proteins* 44 (2001), S. 97–109
-

- 
- [Browne und Proud 2002] BROWNE, G. J. ; PROUD, C. G.: Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. In: *Eur J Biochem* 269 (2002), S. 5360–5368
- [Butel 2000] BUTEL, J. S.: Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. In: *Carcinogenesis* 21 (2000), S. 405–426
- [Byers 2002] BYERS, P. H.: Killing the messenger: new insights into nonsense-mediated mRNA decay. In: *J Clin Invest* 109 (2002), S. 3–6
- [Byrd *et al.* 1982] BYRD, P. J. ; CHIA, W. ; RIGBY, P. W. ; GALLIMORE, P. H.: Cloning of DNA fragments from the left end of the adenovirus type 12 genome: transformation by cloned early region 1. In: *J Gen Virol* 60 (1982), S. 279–293
- [Care *et al.* 1998] CARE, A. ; SILVANI, A. ; MECCIA, E. ; MATTIA, G. ; PESCHLE, C. ; COLOMBO, M. P.: Transduction of the SkBr3 breast carcinoma cell line with the HOXB7 gene induces bFGF expression, increases cell proliferation and reduces growth factor dependence. In: *Oncogene* 16 (1998), S. 3285–3289
- [Care *et al.* 1996] CARE, A. ; SILVANI, A. ; MECCIA, E. ; MATTIA, G. ; STOPPACCIARO, A. ; PARMIANI, G. ; PESCHLE, C. ; COLOMBO, M. P.: HOXB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas. In: *Mol Cell Biol* 16 (1996), S. 4842–4851
- [Care *et al.* 1999] CARE, A. ; VALTIERI, M. ; MATTIA, G. ; MECCIA, E. ; MASELLA, B. ; LUCHETTI, L. ; FELICETTI, F. ; COLOMBO, M. P. ; PESCHLE, C.: Enforced expression of HOXB7 promotes hematopoietic stem cell proliferation and myeloid-restricted progenitor differentiation. In: *Oncogene* 18 (1999), S. 1993–2001
- [Carroll *et al.* 2005] CARROLL, Sean B. ; GRENIER, Jennifer K. ; WEATHERBEE, Scott D.: *From DNA to diversity : molecular genetics and the evolution of animal design.* 2. Auflage. Malden, MA : Blackwell Pub., 2005
- [Carvalho *et al.* 1995] CARVALHO, T. ; SEELER, J. S. ; ÖHMAN, K. ; JORDAN, P. ; PETTERSSON, U. ; AKUSJÄRVI, G. ; CARMO-FONSECA, M. ; DEJEAN, A.: Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies. In: *J Cell Biol* 131 (1995), S. 45–56
- [Castronovo *et al.* 1994] CASTRONOVO, V. ; KUSAKA, M. ; CHARLOT, A. ; GIELEN, J. ; SOBEL, M.: Homeobox genes: potential candidates for the transcriptional control of the transformed and invasive phenotype. In: *Biochem Pharmacol* 47 (1994), S. 137–143
- [Catalucci *et al.* 2005] CATALUCCI, D. ; SPORENO, E. ; CIRILLO, A. ; CILIBERTO, G. ; NICOSIA, A. ; COLLOCA, S.: An adenovirus type 5 (Ad5) amplicon-based packaging cell line for production of high-capacity helper-independent deltaE1-E2-E3-E4 Ad5 vectors. In: *J Virol* 79 (2005), S. 6400–6409
- [Chang und Shenk 1990] CHANG, L. S. ; SHENK, T.: The adenovirus DNA-binding protein stimulates the rate of transcription directed by adenovirus and adeno-associated virus promoters. In: *J Virol* 64 (1990), S. 2103–2109
- [Chauvet *et al.* 2000] CHAUVET, S. ; MERABET, S. ; BILDER, D. ; SCOTT, M. P. ; PRADEL, J. ; GRABA, Y.: Distinct hox protein sequences determine specificity in different tissues. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000), S. 4064–4069
- [Chauvin *et al.* 1990] CHAUVIN, C. ; SUH, M. ; REMY, C. ; BENABID, A. L.: Failure to detect viral genomic sequences of three viruses (herpes simplex, simian virus 40 and adenovirus) in human and rat brain tumors. In: *Ital J Neurol Sci* 11 (1990), S. 347–357
- [Chen *et al.* 2008] CHEN, H. ; LEE, J. S. ; LIANG, X. ; ZHANG, H. ; ZHU, T. ; ZHANG, Z. ; TAYLOR, M. E. ; ZAHNOW, C. ; FEIGENBAUM, L. ; REIN, A. ; SUKUMAR, S.: Hoxb7 inhibits transgenic HER-2/neu-induced mouse mammary tumor onset but promotes progression and lung metastasis. In: *Cancer Res* 68 (2008), S. 3637–3644
- [Chen und Sukumar 2003a] CHEN, H. ; SUKUMAR, S.: HOX genes: emerging stars in cancer. In: *Cancer Biol Ther* 2 (2003), S. 524–525

- 
- [Chen und Sukumar 2003b] CHEN, H. ; SUKUMAR, S.: Role of homeobox genes in normal mammary gland development and breast tumorigenesis. In: *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8 (2003), S. 159–175
- [Cheng *et al.* 2011] CHENG, C. Y. ; GILSON, T. ; DALLAIRE, F. ; KETNER, G. ; BRANTON, P. E. ; BLANCHETTE, P.: The E4orf6/E1B55K E3 ubiquitin ligase complexes of human adenoviruses exhibit heterogeneity in composition and substrate specificity. In: *J Virol* 85 (2011), S. 765–775
- [Chien *et al.* 1991] CHIEN, C. T. ; BARTEL, P. L. ; STERNGLANZ, R. ; FIELDS, S.: The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991), S. 9578–9582
- [Ch'ng und Kenyon 1999] CH'NG, Q. ; KENYON, C.: egl-27 generates anteroposterior patterns of cell fusion in *C. elegans* by regulating Hox gene expression and Hox protein function. In: *Development* 126 (1999), S. 3303–3312
- [Choo *et al.* 1989] CHOO, Q. L. ; KUO, G. ; WEINER, A. J. ; OVERBY, L. R. ; BRADLEY, D. W. ; HOUGHTON, M.: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. In: *Science* 244 (1989), S. 359–362
- [Chopra und Mishra 2006] CHOPRA, V. S. ; MISHRA, R. K.: „Mir“acles in hox gene regulation. In: *Bioessays* 28 (2006), S. 445–448
- [Cillo *et al.* 1992] CILLO, C. ; BARBA, P. ; FRESCHI, G. ; BUCCIARELLI, G. ; MAGLI, M. C. ; BONCINELLI, E.: HOX gene expression in normal and neoplastic human kidney. In: *Int J Cancer* 51 (1992), S. 892–897
- [Cillo *et al.* 2001] CILLO, C. ; CANTILE, M. ; FAIELLA, A. ; BONCINELLI, E.: Homeobox genes in normal and malignant cells. In: *J Cell Physiol* 188 (2001), S. 161–169
- [Colombo *et al.* 1989] COLOMBO, M. ; KUO, G. ; CHOO, Q. L. ; DONATO, M. F. ; DEL NINNO, E. ; TOMMASINI, M. A. ; DIOGUARDI, N. ; HOUGHTON, M.: Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Italian patients with hepatocellular carcinoma. In: *Lancet* 2 (1989), S. 1006–1008
- [Corbi *et al.* 2010] CORBI, N. ; BATASSA, E. M. ; PISANI, C. ; ONORI, A. ; DI CERTO, M. G. ; STRIMPAKOS, G. ; FANCIULLI, M. ; MATTEI, E. ; PASSANANTI, C.: The eEF1gamma subunit contacts RNA polymerase II and binds vimentin promoter region. In: *PLoS One* 5 (2010), S. e14481
- [Corbin-Lickfett und Bridge 2003] CORBIN-LICKFETT, K. A. ; BRIDGE, E.: Adenovirus E4-34kDa requires active proteasomes to promote late gene expression. In: *Virology* 315 (2003), S. 234–244
- [Cress und Nevins 1996a] CRESS, W. D. ; NEVINS, J. R.: A role for a bent DNA structure in E2F-mediated transcription activation. In: *Mol Cell Biol* 16 (1996), S. 2119–2127
- [Cress und Nevins 1996b] CRESS, W. D. ; NEVINS, J. R.: Use of the E2F transcription factor by DNA tumor virus regulatory proteins. In: *Curr Top Microbiol Immunol* 208 (1996), S. 63–78
- [Cutt *et al.* 1987] CUTT, J. R. ; SHENK, T. ; HEARING, P.: Analysis of adenovirus early region 4-encoded polypeptides synthesized in productively infected cells. In: *J Virol* 61 (1987), S. 543–552
- [Dales und Chardonnet 1973] DALES, S. ; CHARDONNET, Y.: Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. IV. Association with microtubules and the nuclear pore complex during vectorial movement of the inoculum. In: *Virology* 56 (1973), S. 465–483
- [Dallaire *et al.* 2009a] DALLAIRE, F. ; BLANCHETTE, P. ; BRANTON, P. E.: A proteomic approach to identify candidate substrates of human adenovirus E4orf6-E1B55K and other viral cullin-based E3 ubiquitin ligases. In: *J Virol* 83 (2009), S. 12172–12184
- [Dallaire *et al.* 2009b] DALLAIRE, F. ; BLANCHETTE, P. ; GROITL, P. ; DOBNER, T. ; BRANTON, P. E.: Identification of integrin alpha3 as a new substrate of the adenovirus E4orf6/E1B 55-kilodalton E3 ubiquitin ligase complex. In: *J Virol* 83 (2009), S. 5329–5338
- [Davison *et al.* 2003] DAVISON, A. J. ; BENKO, M. ; HARRACH, B.: Genetic content and evolution of adenoviruses. In: *J Gen Virol* 84 (2003), S. 2895–2908
-

- 
- [Day *et al.* 1998] DAY, P. M. ; RODEN, R. B. ; LOWY, D. R. ; SCHILLER, J. T.: The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. In: *J Virol* 72 (1998), S. 142–150
- [de The *et al.* 1991] DE THE, H. ; LAVAU, C. ; MARCHIO, A. ; CHOMIENNE, C. ; DEGOS, L. ; DEJEAN, A.: The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. In: *Cell* 66 (1991), S. 675–684
- [Debbas und White 1993] DEBBAS, M. ; WHITE, E.: Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. In: *Genes Dev* 7 (1993), S. 546–554
- [Defer *et al.* 1990] DEFER, C. ; BELIN, M. T. ; CAILLET-BOUDIN, M. L. ; BOULANGER, P.: Human adenovirus-host cell interactions: comparative study with members of subgroups B and C. In: *J Virol* 64 (1990), S. 3661–3673
- [Dellaire und Bazett-Jones 2004] DELLAIRE, G. ; BAZETT-JONES, D. P.: PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. In: *Bioessays* 26 (2004), S. 963–977
- [Dellaire *et al.* 2006] DELLAIRE, G. ; CHING, R. W. ; DEGHANI, H. ; REN, Y. ; BAZETT-JONES, D. P.: The number of PML nuclear bodies increases in early S phase by a fission mechanism. In: *J Cell Sci* 119 (2006), S. 1026–1033
- [Desbois *et al.* 1996] DESBOIS, C. ; ROUSSET, R. ; BANTIGNIES, F. ; JALINOT, P.: Exclusion of int-6 from PML nuclear bodies by binding to the HTLV-I tax oncoprotein. In: *Science* 273 (1996), S. 951–953
- [Dobbelstein *et al.* 1997] DOBBELSTEIN, M. ; ROTH, J. ; KIMBERLY, W. T. ; LEVINE, A. J. ; SHENK, T.: Nuclear export of the E1B 55-kDa and E4 34-kDa adenoviral oncoproteins mediated by a rev-like signal sequence. In: *Embo J* 16 (1997), S. 4276–4284
- [Dobner *et al.* 1996] DOBNER, T. ; HORIKOSHI, N. ; RUBENWOLF, S. ; SHENK, T.: Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor. In: *Science* 272 (1996), S. 1470–1473
- [Dobner und Kzhyshkowska 2001] DOBNER, T. ; KZHYSHKOWSKA, J.: Nuclear export of adenovirus RNA. In: *Curr Top Microbiol Immunol* 259 (2001), S. 25–54
- [Donohoe *et al.* 1999] DONOHOE, M. E. ; ZHANG, X. ; MCGINNIS, L. ; BIGGERS, J. ; LI, E. ; SHI, Y.: Targeted disruption of mouse Yin Yang 1 transcription factor results in peri-implantation lethality. In: *Mol Cell Biol* 19 (1999), S. 7237–7244
- [Doucas und Evans 1999] DOUCAS, V. ; EVANS, R. M.: Human T-cell leukemia retrovirus-Tax protein is a repressor of nuclear receptor signaling. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), S. 2633–2638
- [Doucas *et al.* 1996] DOUCAS, V. ; ISHOV, A. M. ; ROMO, A. ; JUGUILON, H. ; WEITZMAN, M. D. ; EVANS, R. M. ; MAUL, G. G.: Adenovirus replication is coupled with the dynamic properties of the PML nuclear structure. In: *Genes Dev* 10 (1996), S. 196–207
- [Dull *et al.* 1998] DULL, T. ; ZUFFEREY, R. ; KELLY, M. ; MANDEL, R. J. ; NGUYEN, M. ; TRONO, D. ; NALDINI, L.: A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. In: *J Virol* 72 (1998), S. 8463–8471
- [Duprez *et al.* 1992] DUPREZ, E. ; RUCHAUD, S. ; HOUGE, G. ; MARTIN-THOUVENIN, V. ; VALENSI, F. ; KASTNER, P. ; BERGER, R. ; LANOTTE, M.: A retinoid acid 'resistant' t(15;17) acute promyelocytic leukemia cell line: isolation, morphological, immunological, and molecular features. In: *Leukemia* 6 (1992), S. 1281–1287
- [Durfee *et al.* 1993] DURFEE, T. ; BECHERER, K. ; CHEN, P. L. ; YEH, S. H. ; YANG, Y. ; KILBURN, A. E. ; LEE, W. H. ; ELLEDGE, S. J.: The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. In: *Genes Dev.* 7 (1993), S. 555–569
- [Dyson *et al.* 1989] DYSON, N. ; BUCHKOVICH, K. ; WHYTE, P. ; HARLOW, E.: Cellular proteins that are targeted by DNA tumor viruses for transformation. In: *Princess Takamatsu Symp* 20 (1989), S. 191–198

- 
- [Elliott *et al.* 1995] ELLIOTT, W. M. ; HAYASHI, S. ; HOGG, J. C.: Immunodetection of adenoviral E1A proteins in human lung tissue. In: *Am J Respir Cell Mol Biol* 12 (1995), S. 642–648
- [Enders *et al.* 1956] ENDERS, J. F. ; BELL, J. A. ; DINGLE, J. H. ; FRANCIS JR., T. ; HILLEMANN, M. R. ; HUEBNER, R. J. ; PAYNE, A. M.: Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. In: *Science* 124 (1956), S. 119–120
- [Endter und Dobner 2004] ENDTER, C. ; DOBNER, T.: Cell transformation by human adenoviruses. In: *Curr Top Microbiol Immunol* 273 (2004), S. 163–214
- [Endter *et al.* 2005] ENDTER, C. ; HÄRTL, B. ; SPRUSS, T. ; HAUBER, J. ; DOBNER, T.: Blockage of CRM1-dependent nuclear export of the adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa protein augments oncogenic transformation of primary rat cells. In: *Oncogene* 24 (2005), S. 55–64
- [Endter *et al.* 2001] ENDTER, C. ; KZHYSHKOWSKA, J. ; STAUBER, R. ; DOBNER, T.: SUMO-1 modification required for transformation by adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa oncoprotein. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (2001), S. 11312–11317
- [Epstein *et al.* 1965] EPSTEIN, M. A. ; HENLE, G. ; ACHONG, B. G. ; BARR, Y. M.: Morphological and Biological Studies on a Virus in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. In: *J Exp Med* 121 (1965), S. 761–770
- [Esche 1982] ESCHÉ, H.: Viral gene products in adenovirus type-2 transformed hamster cells. In: *J Virol* 41 (1982), S. 1076–1082
- [Esche und Siegmann 1982] ESCHÉ, H. ; SIEGMANN, B.: Expression of early viral gene products in adenovirus type 12-infected and -transformed cells. In: *J Gen Virol* 60 (1982), S. 99–113
- [Everett 2001] EVERETT, R. D.: DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies. In: *Oncogene* 20 (2001), S. 7266–7273
- [Everett 2006] EVERETT, R. D.: Interactions between DNA viruses, ND10 and the DNA damage response. In: *Cell Microbiol* 8 (2006), S. 365–374
- [Everett und Maul 1994] EVERETT, R. D. ; MAUL, G. G.: HSV-1 IE protein Vmw110 causes redistribution of PML. In: *Embo J* 13 (1994), S. 5062–5069
- [Fagioli *et al.* 1992] FAGIOLI, M. ; ALCALAY, M. ; PANDOLFI, P. P. ; VENTURINI, L. ; MENCARELLI, A. ; SIMEONE, A. ; ACAMPORA, D. ; GRIGNANI, F. ; PELICCI, P. G.: Alternative splicing of PML transcripts predicts coexpression of several carboxy-terminally different protein isoforms. In: *Oncogene* 7 (1992), S. 1083–1091
- [Fallaux *et al.* 1998] FALLAUX, F. J. ; BOUT, A. ; VAN DER VELDE, I. ; VAN DEN WOLLENBERG, D. J. ; HEHIR, K. M. ; KEEGAN, J. ; AUGER, C. ; CRAMER, S. J. ; VAN ORMONDT, H. ; VAN DER EB, A. J. ; VALERIO, D. ; HOEBEN, R. C.: New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. In: *Hum Gene Ther* 9 (1998), S. 1909–1917
- [Fallaux *et al.* 1996] FALLAUX, F. J. ; KRANENBURG, O. ; CRAMER, S. J. ; HOUWELING, A. ; VAN ORMONDT, H. ; HOEBEN, R. C. ; VAN DER EB, A. J.: Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. In: *Hum Gene Ther* 7 (1996), S. 215–222
- [Feng *et al.* 2007] FENG, H. ; TAYLOR, J. L. ; BENOS, P. V. ; R., Newton ; WADELL, K. ; LUCAS, S. B. ; CHANG, Y. ; S., Moore P.: Human transcriptome subtraction by using short sequence tags to search for tumor viruses in conjunctival carcinoma. In: *J Virol* 81 (2007), S. 11332–11340
- [Fernandez *et al.* 2008] FERNANDEZ, L. C. ; ERRICO, M. C. ; BOTTERO, L. ; PENKOV, D. ; RESNATI, M. ; BLASI, F. ; CARE, A.: Oncogenic HoxB7 requires TALE cofactors and is inactivated by a dominant-negative Pbx1 mutant in a cell-specific manner. In: *Cancer Lett* 266 (2008), S. 144–155
- [Ferrari *et al.* 2009] FERRARI, R. ; BERK, A. J. ; KURDISTANI, S. K.: Viral manipulation of the host epigenome for oncogenic transformation. In: *Nat Rev Genet* 10 (2009), S. 290–294
-

- 
- [Ferrari *et al.* 2008] FERRARI, R. ; PELLEGRINI, M. ; HORWITZ, G. A. ; XIE, W. ; BERK, A. J. ; KURDISTANI, S. K.: Epigenetic reprogramming by adenovirus e1a. In: *Science* 321 (2008), S. 1086–1088
- [Fields und Song 1989] FIELDS, S. ; SONG, O.: A novel genetic system to detect protein-protein interactions. In: *Nature* 340 (1989), S. 245–246
- [Fischer *et al.* 1999] FISCHER, N. ; VOSS, M. D. ; MUELLER-LANTZSCH, N. ; GRASSER, F. A.: A potential NES of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) does not confer shuttling. In: *FEBS Lett.* 447 (1999), S. 311–314
- [Flint und Gonzalez 2003] FLINT, S. J. ; GONZALEZ, R. A.: Regulation of mRNA production by the adenoviral E1B 55-kDa and E4 Orf6 proteins. In: *Curr Top Microbiol Immunol* 272 (2003), S. 287–330
- [Flint und Sharp 1976] FLINT, S. J. ; SHARP, P. A.: Adenovirus transcription. V. Quantitation of viral RNA sequences in adenovirus 2-infected and transformed cells. In: *J Mol Biol* 106 (1976), S. 749–771
- [Florin *et al.* 2002] FLORIN, L. ; SCHAFFER, F. ; SOTLAR, K. ; STREECK, R. E. ; SAPP, M.: Reorganization of nuclear domain 10 induced by papillomavirus capsid protein 12. In: *Virology* 295 (2002), S. 97–107
- [Frisch und Mymryk 2002] FRISCH, S. M. ; MYMRYK, J. S.: Adenovirus-5 E1A: paradox and paradigm. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (2002), S. 441–452
- [Frischmeyer und Dietz 1999] FRISCHMEYER, P. A. ; DIETZ, H. C.: Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. In: *Hum Mol Genet* 8 (1999), S. 1893–1900
- [Galle *et al.* 2001] GALLE, L. E. ; TAUS, N. S. ; MAGGS, D. J. ; MOORE, C. P. ; MITCHELL, W. J.: Increased severity of herpes simplex virus type 1-induced keratitis in Hox A5 transgenic mice. In: *Curr Eye Res* 23 (2001), S. 435–442
- [Gallimore *et al.* 1984] GALLIMORE, P. H. ; BYRD, P. ; GRAND, R. J. ; WHITTAKER, J. L. ; BREIDING, D. ; WILLIAMS, J.: An examination of the transforming and tumor-inducing capacity of a number of adenovirus type 12 early region 1, hostrange mutants and cells transformed by subgenomic fragments of Ad12 E1 region. In: *Cancer Cells* 2 (1984), S. 519–526
- [Gallimore *et al.* 1985] GALLIMORE, P. H. ; BYRD, P. J. ; WHITTAKER, J. L. ; GRAND, R. J.: 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. In: *Cancer Res* 45 (1985), S. 2670–2680
- [Gallimore *et al.* 1986] GALLIMORE, P. H. ; GRAND, R. J. ; BYRD, P. J.: Transformation of human embryo retinoblasts with simian virus 40, adenovirus and ras oncogenes. In: *Anticancer Res* 6 (1986), S. 499–508
- [Ganem 2006] GANEM, D.: KSHV infection and the pathogenesis of Kaposi's sarcoma. In: *Annu Rev Pathol* 1 (2006), S. 273–296
- [Garnett *et al.* 2009] GARNETT, C. T. ; TALEKAR, G. ; MAHR, J. A. ; HUANG, W. ; ZHANG, Y. ; ORNELLES, D. A. ; GOODING, L. R.: Latent species C adenoviruses in human tonsil tissues. In: *J Virol* 83 (2009), S. 2417–2428
- [Gautier *et al.* 2005] GAUTIER, V. W. ; SHEEHY, N. ; DUFFY, M. ; HASHIMOTO, K. ; HALL, W. W.: Direct interaction of the human I-mfa domain-containing protein, HIC, with HIV-1 Tat results in cytoplasmic sequestration and control of Tat activity. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005), S. 16362–16367
- [Gavis und Hogness 1991] GAVIS, E. R. ; HOGNESS, D. S.: Phosphorylation, expression and function of the Ultrabithorax protein family in *Drosophila melanogaster*. In: *Development* 112 (1991), S. 1077–1093

- 
- [Gay *et al.* 1988] GAY, N. J. ; POOLE, S. J. ; KORNBERG, T. B.: The Drosophila engrailed protein is phosphorylated by a serine-specific protein kinase. In: *Nucleic Acids Res* 16 (1988), S. 6637–6647
- [Gehring 1993] GEHRING, W. J.: Exploring the homeobox. In: *Gene* 135 (1993), S. 215–221
- [Gey *et al.* 1952] GEY, G. O. ; COFFMAN, W. D. ; KUBICEK, M. T.: Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. In: *Cancer Res* 12L (1952), S. 264
- [Giampaolo *et al.* 2002] GIAMPAOLO, A. ; FELLI, N. ; DIVERIO, D. ; MORSILLI, O. ; SAMOGGIA, P. ; BRECCIA, M. ; LO COCO, F. ; PESCHLE, C. ; TESTA, U.: Expression pattern of HOXB6 homeobox gene in myelomonocytic differentiation and acute myeloid leukemia. In: *Leukemia* 16 (2002), S. 1293–1301
- [Giampaolo *et al.* 1994] GIAMPAOLO, A. ; STERPETTI, P. ; BULGARINI, D. ; SAMOGGIA, P. ; PELOSI, E. ; VALTIERI, M. ; PESCHLE, C.: Key functional role and lineage-specific expression of selected HOXB genes in purified hematopoietic progenitor differentiation. In: *Blood* 84 (1994), S. 3637–3647
- [Giard *et al.* 1973] GIARD, R. J. ; AARONSON, S. .. ; TODARO, G. J. ; ARNSTEIN, P. ; KERSEY, J. H. ; DOSIK, H. ; PARKS, W. P.: In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. In: *J Natl Cancer Inst* 51 (1973), S. 1417–1423
- [Gillespie *et al.* 1991] GILLESPIE, S. M. ; CHANG, Y. ; LEMP, G. ; ARTHUR, R. ; BUCHBINDER, S. ; STEIMLE, A. ; BAUMGARTNER, J. ; RANDO, T. ; NEAL, D. ; RUTHERFORD, G. ; ET AL.: Progressive multifocal leukoencephalopathy in persons infected with human immunodeficiency virus, San Francisco, 1981-1989. In: *Ann Neurol* 30 (1991), S. 597–604
- [Ginsberg *et al.* 1966] GINSBERG, H. S. ; PEREIRA, H. G. ; VALENTINE, R. C. ; WILCOX, W. C.: A proposed terminology for the adenovirus antigens and virion morphological subunits. In: *Virology* 28 (1966), S. 782–783
- [Gissmann *et al.* 1984] GISSMANN, L. ; BOSCHART, M. ; DURST, M. ; IKENBERG, H. ; WAGNER, D. ; ZUR HAUSEN, H.: Presence of human papillomavirus in genital tumors. In: *J Invest Dermatol* 83 (1984), S. 26s–28s
- [Goddard *et al.* 1991] GODDARD, A. D. ; BORROW, J. ; FREEMONT, P. S. ; SOLOMON, E.: Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. In: *Science* 254 (1991), S. 1371–1374
- [Golemis und Khazak 1997] GOLEMIS, E. A. ; KHAZAK, V.: Alternative yeast two-hybrid systems. The interaction trap and interaction mating. In: *Methods Mol Biol* 63 (1997), S. 197–218
- [Gonzalez und Flint 2002] GONZALEZ, R. A. ; FLINT, S. J.: Effects of mutations in the adenoviral E1B 55-kilodalton protein coding sequence on viral late mRNA metabolism. In: *J Virol* 76 (2002), S. 4507–4519
- [Goodrum *et al.* 1996] GOODRUM, F. D. ; SHENK, T. ; ORNELLES, D. A.: Adenovirus early region 4 34-kilodalton protein directs the nuclear localization of the early region 1B 55-kilodalton protein in primate cells. In: *J Virol* 70 (1996), S. 6323–6335
- [Gordon *et al.* 2006] GORDON, S. ; AKOPYAN, G. ; GARBAN, H. ; BONAVIDA, B.: Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. In: *Oncogene* 25 (2006), S. 1125–1142
- [Graham 1984] GRAHAM, F. L.: Transformation by and oncogenicity of human adenoviruses. In: GINSBERG, H. S. (Hrsg.): *The adenoviruses*. New York : Plenum Press, 1984, S. 339–398
- [Graham *et al.* 1977] GRAHAM, F. L. ; SMILEY, J. ; RUSSELL, W. C. ; NAIRN, R.: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. In: *J Gen Virol* 36 (1977), S. 59–74
- [Grand *et al.* 1994] GRAND, R. J. ; GRANT, M. L. ; GALLIMORE, P. H.: Enhanced expression of p53 in human cells infected with mutant adenoviruses. In: *Virology* 203 (1994), S. 229–240

- 
- [Greber *et al.* 1997] GREBER, U. F. ; SUOMALAINEN, M. ; STIDWILL, R. P. ; BOUCKE, K. ; EBERSOLD, M. W. ; HELENIUS, A.: The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. In: *Embo J* 16 (1997), S. 5998–6007
- [Grier *et al.* 2005] GRIER, D. G. ; THOMPSON, A. ; KWASNIEWSKA, A. ; MCGONIGLE, G. J. ; HALLIDAY, H. L. ; LAPPIN, T. R.: The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. In: *J Pathol* 205 (2005), S. 154–171
- [Grier *et al.* 2009] GRIER, D. G. ; THOMPSON, A. ; LAPPIN, T. R. ; HALLIDAY, H. L.: Quantification of Hox and surfactant protein-B transcription during murine lung development. In: *Neonatology* 96 (2009), S. 50–60
- [Grifman *et al.* 1999] GRIFMAN, M. ; CHEN, N. N. ; GAO, G. ; CATHOMEN, T. ; WILSON, J. M. ; WEITZMAN, M. D.: Overexpression of cyclin A inhibits augmentation of recombinant adenovirus-associated virus transduction by the adenovirus E4orf6 protein. In: *J Virol* 73 (1999), S. 10010–10019
- [Grobelny *et al.* 2000] GROBELNY, J. V. ; GODWIN, A. K. ; BROCCOLI, D.: ALT-associated PML bodies are present in viable cells and are enriched in cells in the G(2)/M phase of the cell cycle. In: *J Cell Sci* 113 Pt 24 (2000), S. 4577–4585
- [Groitel und Dobner 2007] GROITL, P. ; DOBNER, T.: Construction of adenovirus type 5 early region 1 and 4 virus mutants. In: *Methods Mol Med* 130 (2007), S. 29–39
- [Gurrieri *et al.* 2004a] GURRIERI, C. ; CAPODIECI, P. ; BERNARDI, R. ; SCAGLIONI, P. P. ; NAFA, K. ; RUSH, L. J. ; VERBEL, D. A. ; CORDON-CARDO, C. ; PANDOLFI, P. P.: Loss of the tumor suppressor PML in human cancers of multiple histologic origins. In: *J Natl Cancer Inst* 96 (2004), S. 269–279
- [Gurrieri *et al.* 2004b] GURRIERI, C. ; NAFA, K. ; MERGHOUB, T. ; BERNARDI, R. ; CAPODIECI, P. ; BIONDI, A. ; NIMER, S. ; DOUER, D. ; CORDON-CARDO, C. ; GALLAGHER, R. ; PANDOLFI, P. P.: Mutations of the PML tumor suppressor gene in acute promyelocytic leukemia. In: *Blood* 103 (2004), S. 2358–2362
- [Härtl *et al.* 2008] HÄRTL, B. ; ZELLER, T. ; BLANCHETTE, P. ; KREMMER, E. ; DOBNER, T.: Adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa oncoprotein can promote cell transformation by a mechanism independent from blocking p53-activated transcription. In: *Oncogene* 27 (2008), S. 3673–3684
- [Hahn *et al.* 1999] HAHN, W. C. ; COUNTER, C. M. ; LUNDBERG, A. S. ; BEIJERSBERGEN, R. L. ; BROOKS, M. W. ; WEINBERG, R. A.: Creation of human tumour cells with defined genetic elements. In: *Nature* 400 (1999), S. 464–468
- [Halbert *et al.* 1985] HALBERT, D. N. ; CUTT, J. R. ; SHENK, T.: Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. In: *J Virol* 56 (1985), S. 250–257
- [Haley *et al.* 1984] HALEY, K. P. ; OVERHAUSER, J. ; BABISS, L. E. ; GINSBERG, H. S. ; JONES, N. C.: Transformation properties of type 5 adenovirus mutants that differentially express the E1A gene products. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (1984), S. 5734–5738
- [Hanahan und Meselson 1983] HANAHAN, D. ; MESELSON, M.: Plasmid screening at high colony density. In: *Methods Enzymol* 100 (1983), S. 333–342
- [Harada *et al.* 2002] HARADA, J. N. ; SHEVCHENKO, A. ; PALLAS, D. C. ; BERK, A. J.: Analysis of the adenovirus E1B-55K-anchored proteome reveals its link to ubiquitination machinery. In: *J Virol* 76 (2002), S. 9194–9206
- [Harlow *et al.* 1985] HARLOW, E. ; FRANZA JR., B. R. ; SCHLEY, C.: Monoclonal antibodies specific for adenovirus early region 1A proteins: extensive heterogeneity in early region 1A products. In: *J Virol* 55 (1985), S. 533–546
- [Harlow und Lane 1988] HARLOW, E. ; LANE, D.: In: *Antibodies: A Laboratory Manual*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, S. 139–318
-

- 
- [Hart *et al.* 2005] HART, L. S. ; YANNONE, S. M. ; NACZKI, C. ; ORLANDO, J. S. ; WATERS, S. B. ; AKMAN, S. A. ; CHEN, D. J. ; ORNELLES, D. ; KOU MENIS, C.: The adenovirus E4orf6 protein inhibits DNA double strand break repair and radiosensitizes human tumor cells in an E1B-55K-independent manner. In: *J Biol Chem* 280 (2005), S. 1474–14781
- [Hearing und Shenk 1983] HEARING, P. ; SHENK, T.: The adenovirus type 5 E1A transcriptional control region contains a duplicated enhancer element. In: *Cell* 33 (1983), S. 695–703
- [Hemström *et al.* 1988] HEMSTRÖM, C. ; NORDQVIST, K. ; PETTERSSON, U. ; VIRTANEN, A.: Gene product of region E4 of adenovirus type 5 modulates accumulation of certain viral polypeptides. In: *J Virol* 62 (1988), S. 3258–3264
- [Higashino *et al.* 2005] HIGASHINO, F. ; AOYAGI, M. ; TAKAHASHI, A. ; ISHINO, M. ; TAOKA, M. ; ISOBE, T. ; KOBAYASHI, M. ; TOTSUKA, Y. ; KOHGO, T. ; SHINDOH, M.: Adenovirus E4orf6 targets pp32/LANP to control the fate of ARE-containing mRNAs by perturbing the CRM1-dependent mechanism. In: *J Cell Biol* 170 (2005), S. 15–20
- [Higashino *et al.* 1998] HIGASHINO, F. ; PIPAS, J. M. ; SHENK, T.: Adenovirus E4orf6 oncoprotein modulates the function of the p53-related protein, p73. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (1998), S. 15683–15687
- [Hilleman und Werner 1954] HILLEMAN, M. R. ; WERNER, J. H.: Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. In: *Proc Soc Exp Biol Med* 85 (1954), S. 183–188
- [Hinuma *et al.* 1981] HINUMA, Y. ; NAGATA, K. ; HANAOKA, M. ; NAKAI, M. ; MATSUMOTO, T. ; KINOSHITA, K. I. ; SHIRAKAWA, S. ; MIYOSHI, I.: Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 (1981), S. 6476–6480
- [Horwitz 2001] HORWITZ, M. S.: Adenovirus immunoregulatory genes and their cellular targets. In: *Virology* 279 (2001), S. 1–8
- [Hosokawa und Sung 1976] HOSOKAWA, K. ; SUNG, M. T.: Isolation and characterization of an extremely basic protein from adenovirus type 5. In: *J Virol* 17 (1976), S. 924–934
- [Hsia und McGinnis 2003] HSIA, C. C. ; MCGINNIS, W.: Evolution of transcription factor function. In: *Curr Opin Genet Dev* 13 (2003), S. 199–206
- [Huang *et al.* 2008] HUANG, L. ; XU, G. L. ; ZHANG, J. Q. ; TIAN, L. ; XUE, J. L. ; CHEN, J. Z. ; JIA, W.: Daxx interacts with HIV-1 integrase and inhibits lentiviral gene expression. In: *Biochem Biophys Res Commun* 373 (2008), S. 241–245
- [Huang und Hearing 1989] HUANG, M. M. ; HEARING, P.: Adenovirus early region 4 encodes two gene products with redundant effects in lytic infection. In: *J Virol* 63 (1989), S. 2605–2615
- [Huebner und Todaro 1969] HUEBNER, R. J. ; TODARO, G. J.: Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 64 (1969), S. 1087–1094
- [Hyduk und Percival-Smith 1996] HYDUK, D. ; PERCIVAL-SMITH, A.: Genetic characterization of the homeodomain-independent activity of the *Drosophila fushi tarazu* gene product. In: *Genetics* 142 (1996), S. 481–492
- [Imperiale *et al.* 1995] IMPERIALE, M. J. ; AKUSJÄRVI, G. ; LEPPARD, K. N.: Post-transcriptional control of adenovirus gene expression. In: *Curr Top Microbiol Immunol* 199 (1995), S. 139–171
- [Inoue *et al.* 1998] INOUE, T. ; OKA, K. ; YONG-IL, H. ; VOUSDEN, K. H. ; KYO, S. ; JING, P. ; HAKURA, A. ; YUTSUDO, M.: Dispensability of p53 degradation for tumorigenicity and decreased serum requirement of human papillomavirus type 16 E6. In: *Mol Carcinog* 21 (1998), S. 215–222
- [Ishov und Maul 1996] ISHOV, A. M. ; MAUL, G. G.: The periphery of nuclear domain 10 (ND10) as site of DNA virus deposition. In: *J Cell Biol* 134 (1996), S. 815–826
- [Ito 2004] ITO, Y.: Oncogenic potential of the RUNX gene family: 'overview'. In: *Oncogene* 23 (2004), S. 4198–4208

- 
- [Jacobs *et al.* 1970] JACOBS, J. P. ; JONES, C. M. ; BAILLE, J. P.: Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. In: *Nature* 227 (1970), S. 168–170
- [Jaffe *et al.* 1997] JAFFE, L. ; RYOO, H. D. ; MANN, R. S.: A role for phosphorylation by casein kinase II in modulating Antennapedia activity in *Drosophila*. In: *Genes Dev* 11 (1997), S. 1327–1340
- [Javier *et al.* 1991] JAVIER, R. T. ; RASKA, JR. K. ; MACDONALD, G. J. ; SHENK, T.: Human adenovirus type 9-induced rat mammary tumors. In: *J Virol* 65 (1991), S. 3192–3202
- [Jensen *et al.* 2001] JENSEN, K. ; SHIELS, C. ; FREEMONT, P. S.: PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. In: *Oncogene* 20 (2001), S. 7223–7233
- [Jeong *et al.* 2006] JEONG, S. ; ROKAS, A. ; CARROLL, S. B.: Regulation of body pigmentation by the Abdominal-B Hox protein and its gain and loss in *Drosophila* evolution. In: *Cell* 125 (2006), S. 1387–1399
- [Johnston und Hopper 1982] JOHNSTON, S. A. ; HOPPER, J. E.: Isolation of the yeast regulatory gene GAL4 and analysis of its dosage effects on the galactose/melibiose regulon. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (1982), S. 6971–6975
- [Jones und Shenk 1979] JONES, N. ; SHENK, T.: An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other early viral genes. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (1979), S. 3665–3669
- [Kadota *et al.* 1992] KADOTA, C. ; NAGAHAMA, M. ; TSUTSUI, Y.: Relationship between HOX2 homeobox gene expression and the human cytomegalovirus immediate early genes. In: *J Gen Virol* 73 (Pt 4) (1992), S. 975–981
- [Kakizuka *et al.* 1991] KAKIZUKA, A. ; MILLER JR., W. H. ; UMESONO, K. ; WARRELL JR., R. P. ; FRANKEL, S. R. ; MURTY, V. V. ; DMITROVSKY, E. ; EVANS, R. M.: Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. In: *Cell* 66 (1991), S. 663–674
- [Kao *et al.* 1990] KAO, C. C. ; YEW, P. R. ; BERK, A. J.: Domains required for in vitro association between the cellular p53 and the adenovirus 2 E1B 55K proteins. In: *Virology* 179 (1990), S. 806–814
- [Kindsmüller *et al.* 2007] KINDSMÜLLER, K. ; GROITL, P. ; HÄRTL, B. ; BLANCHETTE, P. ; HAUBER, J. ; DOBNER, T.: Intranuclear targeting and nuclear export of the adenovirus E1B-55K protein are regulated by SUMO1 conjugation. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (2007), S. 6684–6689
- [Kindsmüller *et al.* 2009] KINDSMÜLLER, K. ; SCHREINER, S. ; LEINENKUGEL, F. ; GROITL, P. ; KREMMER, E. ; DOBNER, T.: A 49-kilodalton isoform of the adenovirus type 5 early region 1B 55-kilodalton protein is sufficient to support virus replication. In: *J Virol* 83 (2009), S. 9045–9056
- [Knoepfler und Kamps 1995] KNOEPFLER, P. S. ; KAMPS, M. P.: The pentapeptide motif of Hox proteins is required for cooperative DNA binding with Pbx1, physically contacts Pbx1, and enhances DNA binding by Pbx1. In: *Mol Cell Biol* 15 (1995), S. 5811–5819
- [König *et al.* 1999] KÖNIG, C. ; ROTH, J. ; DOBBELSTEIN, M.: Adenovirus type 5 E4orf3 protein relieves p53 inhibition by E1B-55-kilodalton protein. In: *J Virol* 73 (1999), S. 2253–2262
- [Koken *et al.* 1995] KOKEN, M. H. ; LINARES-CRUZ, G. ; QUIGNON, F. ; VIRON, A. ; CHELBI-ALIX, M. K. ; SOBCZAK-THEPOT, J. ; JUHLIN, L. ; DEGOS, L. ; CALVO, F. ; DE THE, H.: The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis. In: *Oncogene* 10 (1995), S. 1315–1324
- [Kosulin *et al.* 2007] KOSULIN, K. ; HABERLER, C. ; HAINFELLNER, J. A. ; AMANN, G. ; LANG, S. ; LION, T.: Investigation of adenovirus occurrence in pediatric tumor entities. In: *J Virol* 81 (2007), S. 7629–7635
- [Koyuncu 2009] KOYUNCU, O.: *Role of the Adenovirus Type 5 L4-100K Protein during Lytic Infection*, Universität Hamburg, Diss., 2009

- 
- [Krätzer *et al.* 2000] KRÄTZER, F. ; ROSORIUS, O. ; HEGER, P. ; HIRSCHMANN, N. ; DOBNER, T. ; HAUBER, J. ; STAUBER, R. H.: The adenovirus type 5 E1B-55k oncoprotein is a highly active shuttle protein and shuttling is independent of E4orf6, p53 and Mdm2. In: *Oncogene* 19 (2000), S. 850–857
- [Krumlauf 1994] KRUMLAUF, R.: Hox genes in vertebrate development. In: *Cell* 78 (1994), S. 191–201
- [Kuwano *et al.* 1997] KUWANO, K. ; KAWASAKI, M. ; KUNITAKE, R. ; HAGIMOTO, N. ; NOMOTO, Y. ; MATSUBA, T. ; NAKANISHI, Y. ; HARA, N.: Detection of group C adenovirus DNA in small-cell lung cancer with the nested polymerase chain reaction. In: *J Cancer Res Clin Oncol* 123 (1997), S. 377–382
- [Kyratsous und Silverstein 2009] KYRATSOUS, C. A. ; SILVERSTEIN, S. J.: Components of nuclear domain 10 bodies regulate varicella-zoster virus replication. In: *J Virol* 83 (2009), S. 4262–4274
- [Laemmli 1970] LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), S. 680–685
- [Lafarga *et al.* 2002] LAFARGA, M. ; BERCIANO, M. T. ; PENA, E. ; MAYO, I. ; CASTANO, J. G. ; BOHMANN, D. ; RODRIGUES, J. P. ; TAVANEZ, J. P. ; CARMO-FONSECA, M.: Clastosome: a subtype of nuclear body enriched in 19S and 20S proteasomes, ubiquitin, and protein substrates of proteasome. In: *Mol Biol Cell* 13 (2002), S. 2771–2782
- [Lallemand-Breitenbach *et al.* 2001] LALLEMAND-BREITENBACH, V. ; ZHU, J. ; PUVION, F. ; KOKEN, M. ; HONORE, N. ; DOUBEIKOVSKY, A. ; DUPREZ, E. ; PANDOLFI, P. P. ; PUVION, E. ; FREEMONT, P. ; DE THE, H.: Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. In: *J Exp Med* 193 (2001), S. 1361–1371
- [Lawrence *et al.* 2005] LAWRENCE, H. J. ; FISCHBACH, N. A. ; LARGMAN, C.: HOX genes: not just myeloid oncogenes any more. In: *Leukemia* 19 (2005), S. 1328–1330
- [Lawrence *et al.* 1996] LAWRENCE, H. J. ; SAUVAGEAU, G. ; HUMPHRIES, R. K. ; LARGMAN, C.: The role of HOX homeobox genes in normal and leukemic hematopoiesis. In: *Stem Cells* 14 (1996), S. 281–291
- [Lechner *et al.* 2001] LECHNER, J. F. ; FUGARO, J. M. ; WONG, Y. ; PASS, H. I. ; HARRIS, C. C. ; BELINSKY, S. A.: Perspective: cell differentiation theory may advance early detection of and therapy for lung cancer. In: *Radiat Res* 155 (2001), S. 235–238
- [Lee *et al.* 1995] LEE, J. S. ; SEE, R. H. ; GALVIN, K. M. ; WANG, J. ; SHI, Y.: Functional interactions between YY1 and adenovirus E1A. In: *Nucleic Acids Res* 23 (1995), S. 925–931
- [Lee *et al.* 1987] LEE, W. H. ; BOOKSTEIN, R. ; HONG, F. ; YOUNG, L. J. ; SHEW, J. Y. ; LEE, E. Y.: Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. In: *Science* 235 (1987), S. 1394–1399
- [Lemons und McGinnis 2006] LEMONS, D. ; MCGINNIS, W.: Genomic evolution of Hox gene clusters. In: *Science* 313 (2006), S. 1918–1922
- [Leppard 1997] LEPPARD, K. N.: E4 gene function in adenovirus, adenovirus vector and adeno-associated virus infections. In: *J Gen Virol* 78 (1997), S. 2131–2138
- [Lethbridge *et al.* 2003] LETHBRIDGE, K. J. ; SCOTT, G. E. ; LEPPARD, K. N.: Nuclear matrix localization and SUMO-1 modification of adenovirus type 5 E1b 55K protein are controlled by E4 Orf6 protein. In: *J Gen Virol* 84 (2003), S. 259–268
- [Lillie und Green 1989] LILLIE, J. W. ; GREEN, M. R.: Transcription activation by the adenovirus E1a protein. In: *Nature* 338 (1989), S. 39–44
- [Limb *et al.* 2002] LIMB, G. A. ; SALT, T. E. ; MUNRO, P. M. ; MOSS, S. E. ; KHAW, P. T.: In vitro characterization of a spontaneously immortalized human Muller cell line (MIO-M1). In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43 (2002), S. 864–869
-

- 
- [Linzer und Levine 1979] LINZER, D. I. ; LEVINE, A. J.: Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. In: *Cell* 17 (1979), S. 43–52
- [Liu *et al.* 1995] LIU, D. ; BIENKOWSKA, J. ; PETOSA, C. ; COLLIER, R. J. ; FU, H. ; LIDDINGTON, R.: Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. In: *Nature* 376 (1995), S. 191–194
- [Liu *et al.* 1997] LIU, J. ; LYNCH, P. A. ; CHIEN, C. Y. ; MONTELIONE, G. T. ; KRUG, R. M. ; BERMAN, H. M.: Crystal structure of the unique RNA-binding domain of the influenza virus NS1 protein. In: *Nat Struct Biol* 4 (1997), S. 896–899
- [Liu *et al.* 1999] LIU, Y. ; CHEN, J. J. ; GAO, Q. ; DALAL, S. ; HONG, Y. ; MANSUR, C. P. ; BAND, V. ; ANDROPHY, E. J.: Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells. In: *J Virol* 73 (1999), S. 7297–7307
- [Liu *et al.* 2005] LIU, Y. ; SHEVCHENKO, A. ; BERK, A. J.: Adenovirus exploits the cellular aggresome response to accelerate inactivation of the MRN complex. In: *J Virol* 79 (2005), S. 14004–14016
- [Lonberg-Holm und Philipson 1969] LONBERG-HOLM, K. ; PHILIPSON, L.: Early events of virus-cell interaction in an adenovirus system. In: *J Virol* 4 (1969), S. 323–338
- [Lowe und Ruley 1993] LOWE, S. W. ; RULEY, H. E.: Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. In: *Genes Dev* 7 (1993), S. 535–545
- [Lu *et al.* 1995] LU, Q. ; KNOEPFLER, P. S. ; SCHEELE, J. ; WRIGHT, D. D. ; KAMPS, M. P.: Both Pbx1 and E2A-Pbx1 bind the DNA motif ATCAATCAA cooperatively with the products of multiple murine Hox genes, some of which are themselves oncogenes. In: *Mol Cell Biol* 15 (1995), S. 3786–3795
- [Mackey *et al.* 1979] MACKEY, J. K. ; GREEN, M. ; WOLD, W. S. M. ; RIDGEN, P.: Analysis of human cancer DNA for DNA sequences of human adenovirus type 4. In: *J Natl Cancer Inst* 62 (1979), S. 23–26
- [Mackey *et al.* 1976] MACKEY, J. K. ; RIDGEN, P. M. ; GREEN, M.: Do highly oncogenic group A human adenoviruses cause human cancer? Analysis of human tumors for adenovirus 12 transforming DNA sequences. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 73 (1976), S. 4657–4661
- [Mark *et al.* 1997] MARK, M. ; RIJLI, F. M. ; CHAMBON, P.: Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis. In: *Pediatr Res* 42 (1997), S. 421–429
- [Marshall *et al.* 2008] MARSHALL, L. J. ; MOORE, A. C. ; OHKI, M. ; KITABAYASHI, I. ; PATTERSON, D. ; ORNELLES, D. A.: RUNX1 permits E4orf6-directed nuclear localization of the adenovirus E1B-55K protein and associates with centers of viral DNA and RNA synthesis. In: *J Virol* 82 (2008), S. 6395–6408
- [Martin und Berk 1998] MARTIN, M. E. ; BERK, A. J.: Adenovirus E1B 55K represses p53 activation in vitro. In: *J Virol* 72 (1998), S. 3146–3154
- [Martin und Berk 1999] MARTIN, M. E. ; BERK, A. J.: Corepressor required for adenovirus E1B 55,000-molecular-weight protein repression of basal transcription. In: *Mol Cell Biol* 19 (1999), S. 3403–3414
- [Marton *et al.* 1990] MARTON, M. J. ; BAIM, S. B. ; ORNELLES, D. A. ; SHENK, T.: 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. In: *J Virol* 64 (1990), S. 2345–2359
- [Maul *et al.* 1993] MAUL, G. G. ; GULDNER, H. H. ; SPIVACK, J. G.: Modification of discrete nuclear domains induced by herpes simplex virus type 1 immediate early gene 1 product (ICP0). In: *J Gen Virol* 74 (Pt 12) (1993), S. 2679–2690
- [Maul *et al.* 1996] MAUL, G. G. ; ISHOV, A. M. ; EVERETT, R. D.: Nuclear domain 10 as preexisting potential replication start sites of herpes simplex virus type-1. In: *Virology* 217 (1996), S. 67–75
-

- 
- [Maulbecker und Gruss 1993] MAULBECKER, C. C. ; GRUSS, P.: The oncogenic potential of deregulated homeobox genes. In: *Cell Growth Differ* 4 (1993), S. 431–441
- [McBride und Wiener 1964] MCBRIDE, W. D. ; WIENER, A.: In Vitro Transformation of Hamster Kidney Cells by Human Adenovirus Type 12. In: *Proc Soc Exp Biol Med* 115 (1964), S. 870–874
- [McGinnis und Krumlauf 1992] MCGINNIS, W. ; KRUMLAUF, R.: Homeobox genes and axial patterning. In: *Cell* 68 (1992), S. 283–302
- [McLaughlin *et al.* 2003] MCLAUGHLIN, G. E. ; DELIS, S. ; KASHIMAWO, L. ; CANTWELL, G. P. ; MITTAL, N. ; CIROCCO, R. E. ; RUIZ, P. ; KATO, T. ; TZAKIS, A. G.: Adenovirus infection in pediatric liver and intestinal transplant recipients: utility of DNA detection by PCR. In: *Am J Transplant* 3 (2003), S. 224–228
- [McLaughlin-Drubin und Munger 2008] MCLAUGHLIN-DRUBIN, M. E. ; MUNGER, K.: Viruses associated with human cancer. In: *Biochim Biophys Acta* 1782 (2008), S. 127–150
- [McLorie *et al.* 1991] MCLORIE, W. ; MCGLADE, C. J. ; TAKAYESU, D. ; BRANTON, P. E.: Individual adenovirus E1B proteins induce transformation independently but by additive pathways. In: *J Gen Virol* 72 ( Pt 6) (1991), S. 1467–1471
- [Meccia *et al.* 2003] MECCIA, E. ; BOTTERO, L. ; FELICETTI, F. ; PESCHLE, C. ; COLOMBO, M. P. ; CARE, A.: HOXB7 expression is regulated by the transcription factors NF-Y, YY1, Sp1 and USF-1. In: *Biochim Biophys Acta* 1626 (2003), S. 1–9
- [Medghalchi *et al.* 1997] MEDGHALCHI, S. ; PADMANABHAN, R. ; KETNER, G.: Early region 4 modulates adenovirus DNA replication by two genetically separable mechanisms. In: *Virology* 236 (1997), S. 8–17
- [Miller *et al.* 2007] MILLER, D. L. ; MYERS, C. L. ; RICKARDS, B. ; COLLER, H. A. ; FLINT, S. J.: Adenovirus type 5 exerts genome-wide control over cellular programs governing proliferation, quiescence, and survival. In: *Genome Biol* 8 (2007), S. R58
- [Miller *et al.* 2003] MILLER, G. J. ; MILLER, H. L. ; VAN BOKHOVEN, A. ; LAMBERT, J. R. ; WERAHERA, P. N. ; SCHIRRIPA, O. ; LUCIA, M. S. ; NORDEEN, S. K.: Aberrant HOXC expression accompanies the malignant phenotype in human prostate. In: *Cancer Res* 63 (2003), S. 5879–5888
- [Miron *et al.* 2009] MIRON, M. J. ; BLANCHETTE, P. ; GROITL, P. ; DALLAIRE, F. ; TEODORO, J. G. ; LI, S. ; DOBNER, T. ; BRANTON, P. E.: Localization and importance of the adenovirus E4orf4 protein during lytic infection. In: *J Virol* 83 (2009), S. 1689–1699
- [Mitchell *et al.* 1993] MITCHELL, W. J. ; DE SANTO, R. J. ; ZHANG, S. D. ; ODENWALD, W. F. ; ARNHEITER, H.: Herpes simplex virus pathogenesis in transgenic mice is altered by the homeodomain protein Hox 1.3. In: *J Virol* 67 (1993), S. 4484–4491
- [Mitsudomi *et al.* 1992] MITSUDOMI, T. ; STEINBERG, S. M. ; NAU, M. M. ; CARBONE, D. ; D'AMICO, D. ; BODNER, H. K. ; OIE, H. K. ; LINNOILA, R. I. ; MULSHINE, J. L. ; MINNA, J. D. ; GAZDAR, A. F.: p53 gene mutations in non-small-lung cell cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. In: *Oncogene* 7 (1992), S. 171–180
- [Modrow und Falke 2002] MODROW, S. ; FALKE, D.: *Molekulare Virologie (2. Auflage)*. Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2002
- [Moore *et al.* 1996] MOORE, M. ; HORIKOSHI, N. ; SHENK, T.: Oncogenic potential of the adenovirus E4orf6 protein. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (1996), S. 11295–11301
- [Moran *et al.* 1986] MORAN, E. ; GRODZICKER, T. ; ROBERTS, R. J. ; MATHEWS, M. B. ; ZERLER, B.: Lytic and transforming functions of individual products of the adenovirus E1A gene. In: *J Virol* 57 (1986), S. 765–775
- [Morasso *et al.* 1996] MORASSO, M. I. ; MARKOVA, N. G. ; SARGENT, T. D.: Regulation of epidermal differentiation by a Distal-less homeodomain gene. In: *J Cell Biol* 135 (1996), S. 1879–1887

- 
- [Morgan *et al.* 2004] MORGAN, M. J. ; WOLTERING, J. M. ; IN DER RIEDEN, P. M. ; DURSTON, A. J. ; THIERY, J. P.: YY1 regulates the neural crest-associated slug gene in *Xenopus laevis*. In: *J Biol Chem* 279 (2004), S. 46826–46834
- [Mukai und Bowers 1975] MUKAI, N. ; BOWERS, W. C.: [Viruses and brain tumors (author's transl)]. In: *No Shinkei Geka* 3 (1975), S. 91–112
- [Mymryk *et al.* 1994] MYMRYK, J. S. ; SHIRE, K. ; BAYLEY, S. T.: Induction of apoptosis by adenovirus type 5 E1A in rat cells requires a proliferation block. In: *Oncogene* 9 (1994), S. 1187–1193
- [Naguibneva *et al.* 2006] NAGUIBNEVA, I. ; AMEYAR-ZAZOUA, M. ; POLESSKAYA, A. ; AIT-SI-ALI, S. ; GROISMAN, R. ; SOUIDI, M. ; CUVELLIER, S. ; HAREL-BELLAN, A.: The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. In: *Nat Cell Biol* 8 (2006), S. 278–284
- [Naora *et al.* 2001] NAORA, H. ; YANG, Y. Q. ; MONTZ, F. J. ; SEIDMAN, J. D. ; KURMAN, R. J. ; RODEN, R. B.: A serologically identified tumor antigen encoded by a homeobox gene promotes growth of ovarian epithelial cells. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001), S. 4060–4065
- [Neill und Nevins 1991] NEILL, S. D. ; NEVINS, J. R.: Genetic analysis of the adenovirus E4 6/7 trans activator: interaction with E2F and induction of a stable DNA-protein complex are critical for activity. In: *J Virol* 65 (1991), S. 5364–5373
- [Nemerow und Stewart 1999] NEMEROW, G. R. ; STEWART, P. L.: Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery. In: *Microbiol Mol Biol Rev* 63 (1999), S. 725–734
- [Nevels und Dobner 2006] NEVELS, M. ; DOBNER, T.: Determination of the transforming activities of adenovirus oncogenes. In: WOLD, W. S. (Hrsg.) ; TOLLEFSON, A. E. (Hrsg.): *Adenovirus Methods and Protocols* Bd. 2. 2. Auflage. Totowa, NJ : Humana Press Inc., 2006, S. 187–195
- [Nevels *et al.* 1997] NEVELS, M. ; RUBENWOLF, S. ; SPRUSS, T. ; WOLF, H. ; DOBNER, T.: The adenovirus E4orf6 protein can promote E1A/E1B-induced focus formation by interfering with p53 tumor suppressor function. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), S. 1206–1211
- [Nevels *et al.* 2000] NEVELS, M. ; RUBENWOLF, S. ; SPRUSS, T. ; WOLF, H. ; DOBNER, T.: Two distinct activities contribute to the oncogenic potential of the adenovirus type 5 E4orf6 protein. In: *J Virol* 74 (2000), S. 5168–5181
- [Nevels *et al.* 1999a] NEVELS, M. ; SPRUSS, T. ; WOLF, H. ; DOBNER, T.: The adenovirus E4orf6 protein contributes to malignant transformation by antagonizing E1A-induced accumulation of the tumor suppressor protein p53. In: *Oncogene* 18 (1999), S. 9–17
- [Nevels *et al.* 1999b] NEVELS, M. ; TÄUBER, B. ; KREMMER, E. ; SPRUSS, T. ; WOLF, H. ; DOBNER, T.: Transforming potential of the adenovirus type 5 E4orf3 protein. In: *J Virol* 73 (1999), S. 1591–1600
- [Nevels *et al.* 2001] NEVELS, M. ; TÄUBER, B. ; SPRUSS, T. ; WOLF, H. ; DOBNER, T.: „Hit-and-run“ transformation by adenovirus oncogenes. In: *J Virol* 75 (2001), S. 3089–3094
- [Nevins *et al.* 1979] NEVINS, J. R. ; GINSBERG, H. S. ; BLANCHARD, J. M. ; WILSON, M. C. ; DARNELL JR., J. E.: Regulation of the primary expression of the early adenovirus transcription units. In: *J Virol* 32 (1979), S. 727–733
- [Nevins und Vogt 1996] NEVINS, J. R. ; VOGT, P. K.: Cell Transformation by Viruses. In: *Virology* Bd. 1. 3. Auflage. New York : Lippincott-Raven, 1996, S. 301–343
- [Nevins und Vogt 2007] NEVINS, J. R. ; VOGT, P. K.: Cell Transformation by Viruses. In: *Virology* Bd. 1. 5. Auflage. New York : Lippincott Williams & Wilkins, 2007
- [Nisole *et al.* 2005] NISOLE, S. ; STOYE, J. P. ; SAIB, A.: TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. In: *Nat Rev Microbiol* 3 (2005), S. 799–808
- [Nordqvist *et al.* 1994] NORDQVIST, K. ; ÖHMAN, K. ; AKUSJÄRVI, G.: Human adenovirus encodes two proteins which have opposite effects on accumulation of alternatively spliced mRNAs. In: *Mol Cell Biol* 14 (1994), S. 437–445
-

- 
- [Öhman *et al.* 1993] ÖHMAN, K. ; NORDQVIST, K. ; AKUSJÄRVI, G.: Two adenovirus proteins with redundant activities in virus growth facilitates tripartite leader mRNA accumulation. In: *Virology* 194 (1993), S. 50–58
- [Öhman *et al.* 1995] ÖHMAN, K. ; NORDQUIST, K. ; LINDER, S. ; AKUSJÄRVI, G.: Effect of adenovirus-2 early region 4 products on E1 transformation. In: *Int J Oncol* 6 (1995), S. 663–668
- [Orazio *et al.* 2011] ORAZIO, N. I. ; NAEGER, C. M. ; KARLSEDER, J. ; WEITZMAN, M. D.: The adenovirus E1b55K/E4orf6 complex induces degradation of the Bloom helicase during infection. In: *J Virol* 85 (2011), S. 1887–1892
- [Orlando und Ornelles 1999] ORLANDO, J. S. ; ORNELLES, D. A.: An arginine-faced amphipathic alpha helix is required for adenovirus type 5 e4orf6 protein function. In: *J Virol* 73 (1999), S. 4600–4610
- [Orlando und Ornelles 2002] ORLANDO, J. S. ; ORNELLES, D. A.: E4orf6 variants with separate abilities to augment adenovirus replication and direct nuclear localization of the E1B 55-kilodalton protein. In: *J Virol* 76 (2002), S. 1475–1487
- [Ornelles und Shenk 1991] ORNELLES, D. A. ; SHENK, T.: Localization of the adenovirus early region 1B 55-kilodalton protein during lytic infection: association with nuclear viral inclusions requires the early region 4 34-kilodalton protein. In: *J Virol* 65 (1991), S. 424–429
- [Pandolfi *et al.* 1992] PANDOLFI, P. P. ; ALCALAY, M. ; FAGIOLI, M. ; ZANGRILLI, D. ; MENCARELLI, A. ; DIVERIO, D. ; BIONDI, A. ; LO COCO, F. ; RAMBALDI, A. ; GRIGNANI, F. ; AL. et: Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RAR alpha transcripts that encode aberrant PML proteins and PML/RAR alpha isoforms in acute promyelocytic leukemia. In: *EMBO J* 11 (1992), S. 1397–1407
- [Pearson *et al.* 2005] PEARSON, J. C. ; LEMONS, D. ; MCGINNIS, W.: Modulating Hox gene functions during animal body patterning. In: *Nat Rev Genet* 6 (2005), S. 893–904
- [Pearson *et al.* 2000] PEARSON, M. ; CARBONE, R. ; SEBASTIANI, C. ; CIOCE, M. ; FAGIOLI, M. ; SAITO, S. ; HIGASHIMOTO, Y. ; APPELLA, E. ; MINUCCI, S. ; PANDOLFI, P. P. ; PELICCI, P. G.: PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. In: *Nature* 406 (2000), S. 207–210
- [Phelan *et al.* 1995] PHELAN, M. L. ; RAMBALDI, I. ; FEATHERSTONE, M. S.: Cooperative interactions between HOX and PBX proteins mediated by a conserved peptide motif. In: *Mol Cell Biol* 15 (1995), S. 3989–3997
- [Pilder *et al.* 1986] PILDER, S. ; MOORE, M. ; LOGAN, J. ; SHENK, T.: The adenovirus E1B-55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilization of viral and host cell mRNAs. In: *Mol Cell Biol* 6 (1986), S. 470–476
- [Plowright *et al.* 2009] PLOWRIGHT, L. ; HARRINGTON, K. J. ; PANDHA, H. S. ; MORGAN, R.: HOX transcription factors are potential therapeutic targets in non-small-cell lung cancer (targeting HOX genes in lung cancer). In: *Br J Cancer* 100 (2009), S. 470–475
- [Poiesz *et al.* 1980] POIESZ, B. J. ; RUSCETTI, F. W. ; GAZDAR, A. F. ; BUNN, P. A. ; MINNA, J. D. ; GALLO, R. C.: Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 77 (1980), S. 7415–7419
- [Ponten und Saksela 1967] PONTEN, J. ; SAKSELA, E.: Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours. In: *Int J Cancer* 2 (1967), S. 434–447
- [Pozzuto *et al.* 2011] POZZUTO, T. ; VON KIETZELL, K. ; BOCK, T. ; SCHMIDT-LUCKE, C. ; POLLER, W. ; ZOBEL, T. ; LASSNER, D. ; ZEICHHARDT, H. ; WEGER, S. ; FECHNER, H.: Transactivation of human parvovirus B19 gene expression in endothelial cells by adenoviral helper functions. In: *Virology* 411 (2011), S. 50–64
- [Puvion-Dutilleul *et al.* 1995a] PUVION-DUTILLEUL, F. ; CHELBI-ALIX, M. K. ; KOKEN, M. ; QUIGNON, F. ; PUVION, E. ; DE THE, H.: Adenovirus infection induces rearrangements in the intranuclear distribution of the nuclear body-associated PML protein. In: *Exp Cell Res* 218 (1995), S. 9–16

- 
- [Puvion-Dutilleul *et al.* 1995b] PUVION-DUTILLEUL, F. ; VENTURINI, L. ; GUILLEMIN, M. C. ; DE THE, H. ; PUVION, E.: Sequestration of PML and Sp100 proteins in an intranuclear viral structure during herpes simplex virus type 1 infection. In: *Exp Cell Res* 221 (1995), S. 448–461
- [Querido *et al.* 2001a] QUERIDO, E. ; BLANCHETTE, P. ; YAN, Q. ; KAMURA, T. ; MORRISON, M. ; BOIVIN, D. ; KAELIN, W. G. ; CONAWAY, R. C. ; CONAWAY, J. W. ; BRANTON, P. E.: Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. In: *Genes Dev* 15 (2001), S. 3104–3117
- [Querido *et al.* 1997] QUERIDO, E. ; MARCELLUS, R. C. ; LAI, A. ; RACHEL, C. ; TEODORO, J. G. ; KETNER, G. ; BRANTON, P. E.: Regulation of p53 levels by the E1B 55-kilodalton protein and E4orf6 in adenovirus-infected cells. In: *J Virol* 71 (1997), S. 3788–3798
- [Querido *et al.* 2001b] QUERIDO, E. ; MORRISON, M. R. ; CHU-PHAM-DANG, H. ; THIRLWELL, S. W. ; BOIVIN, D. ; BRANTON, P. E.: Identification of three functions of the adenovirus e4orf6 protein that mediate p53 degradation by the E4orf6-E1B55K complex. In: *J Virol* 75 (2001), S. 699–709
- [Rabino *et al.* 2000] RABINO, C. ; ASPEGREN, A. ; CORBIN-LICKFETT, K. ; BRIDGE, E.: Adenovirus late gene expression does not require a rev-like nuclear RNA export pathway. In: *J Virol* 74 (2000), S. 6684–6688
- [Raman *et al.* 2000] RAMAN, V. ; MARTENSEN, S. A. ; REISMAN, D. ; EVRON, E. ; ODENWALD, W. F. ; JAFFEE, E. ; MARKS, J. ; SUKUMAR, S.: Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. In: *Nature* 405 (2000), S. 974–978
- [Reich *et al.* 1983] REICH, N.C. ; SARNOW, P. ; DUPREY, E. ; LEVINE, A.J.: Monoclonal antibodies which recognize native and denatured forms of the adenovirus DNA-binding protein. In: *Virology* 128 (1983), S. 480–484
- [Ricciardi *et al.* 1981] RICCIARDI, R. P. ; JONES, R. L. ; CEPKO, C. L. ; SHARP, P. A. ; ROBERTS, B. E.: Expression of early adenovirus genes requires a viral encoded acidic polypeptide. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 (1981), S. 6121–6125
- [Ringrose und Paro 2004] RINGROSE, L. ; PARO, R.: Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. In: *Annu Rev Genet* 38 (2004), S. 413–443
- [Rous 1911] ROUS, P.: A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. In: *J Exp Med* 13 (1911), S. 397–411
- [Rowe *et al.* 1953] ROWE, W. P. ; HUEBNER, R. J. ; GILMORE, L. K. ; PARROTT, R. H. ; WARD, T. G.: Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. In: *Proc Soc Exp Biol Med* 84 (1953), S. 570–573
- [Rubenwolf *et al.* 1997] RUBENWOLF, S. ; SCHÜTT, H. ; NEVELS, M. ; WOLF, H. ; DOBNER, T.: Structural analysis of the adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton-E4orf6 protein complex. In: *J Virol* 71 (1997), S. 1115–1123
- [Rubin *et al.* 2007] RUBIN, E. ; WU, X. ; ZHU, T. ; CHEUNG, J. C. ; CHEN, H. ; LORINCZ, A. ; PANDITA, R. K. ; SHARMA, G. G. ; HA, H. C. ; GASSON, J. ; HANAKAHI, L. A. ; PANDITA, T. K. ; SUKUMAR, S.: A role for the HOXB7 homeodomain protein in DNA repair. In: *Cancer Res* 67 (2007), S. 1527–1535
- [Ruggero *et al.* 2000] RUGGERO, D. ; WANG, Z. G. ; PANDOLFI, P. P.: The puzzling multiple lives of PML and its role in the genesis of cancer. In: *Bioessays* 22 (2000), S. 827–835
- [Ruley 1983] RULEY, H. E.: Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. In: *Nature* 304 (1983), S. 602–606
- [Russel 2000] RUSSEL, W. C.: Update on adenovirus and its vectors. In: *J Gen Virol* 81 (2000), S. 2573–2604
- [Russell 2009] RUSSELL, W. C.: Adenoviruses: update on structure and function. In: *J Gen Virol* 90 (2009), S. 1–20

- 
- [Rux und Burnett 2004] RUX, J. J. ; BURNETT, R. M.: Adenovirus structure. In: *Hum Gene Ther* 15 (2004), S. 1167–1176
- [Sabbatini *et al.* 1995] SABBATINI, P. ; CHIOU, S. K. ; RAO, L. ; WHITE, E.: Modulation of p53-mediated transcriptional repression and apoptosis by the adenovirus E1B 19K protein. In: *Mol Cell Biol* 15 (1995), S. 1060–1070
- [Saiki *et al.* 1988] SAIKI, R. K. ; GELFAND, D. H. ; STOFFEL, S. ; SCHARF, S. J. ; HIGUCHI, R. ; HORN, G. T. ; MULLIS, K. B. ; ERLICH, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. In: *Science* 239 (1988), S. 487–491
- [Salomon und Lewis 2004] SALOMON, D. S. ; LEWIS, M. T.: Embryogenesis and oncogenesis: Dr Jekyll and Mr Hyde. In: *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9 (2004), S. 105–107
- [Salomoni *et al.* 2008] SALOMONI, P. ; FERGUSON, B. J. ; WYLLIE, A. H. ; RICH, T.: New insights into the role of PML in tumour suppression. In: *Cell Res* 18 (2008), S. 622–640
- [Salomoni und Pandolfi 2002] SALOMONI, P. ; PANDOLFI, P. P.: The role of PML in tumor suppression. In: *Cell* 108 (2002), S. 165–170
- [Sambrook *et al.* 1989] SAMBROOK, J. ; FRITSCH, E. F. ; MANIATIS, T.: *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [San Martin und Burnett 2003] SAN MARTIN, C. ; BURNETT, R. M.: Structural studies on adenoviruses. In: *Curr Top Microbiol Immunol* 272 (2003), S. 57–94
- [Sarnow *et al.* 1982a] SARNOW, P. ; HO, Y. S. ; WILLIAMS, J. ; LEVINE, A. J.: Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. In: *Cell* 28 (1982), S. 387–394
- [Sarnow *et al.* 1982b] SARNOW, P. ; SULLIVAN, C. A. ; LEVINE, A. J.: 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. In: *Virology* 120 (1982), S. 510–517
- [Scaglioni *et al.* 2006] SCAGLIONI, P. P. ; YUNG, T. M. ; CAI, L. F. ; ERDJUMENT-BROMAGE, H. ; KAUFMAN, A. J. ; SINGH, B. ; TERUYA-FELDSTEIN, J. ; TEMPST, P. ; PANDOLFI, P. P.: A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor. In: *Cell* 126 (2006), S. 269–283
- [Schiedner *et al.* 2000] SCHIEDNER, G. ; HERTEL, S. ; KOCHAN, J. C. ; NGSEE, J. K. ; TRAYKOVA-ANDONOVA, M. ; HACHE, R. J.: Efficient transformation of primary human amniocytes by E1 functions of Ad5: generation of new cell lines for adenoviral vector production. In: *Hum Gene Ther* 11 (2000), S. 2105–2116
- [Schild-Poulter *et al.* 2001] SCHILD-POULTER, C. ; POPE, L. ; GIFFIN, W. ; KOCHAN, J. C. ; NGSEE, J. K. ; TRAYKOVA-ANDONOVA, M. ; HACHE, R. J.: The binding of Ku antigen to homeodomain proteins promotes their phosphorylation by DNA-dependent protein kinase. In: *J Biol Chem* 276 (2001), S. 16848–16856
- [Schreiner *et al.* 2010] SCHREINER, S. ; WIMMER, P. ; SIRMA, H. ; EVERETT, R. D. ; BLANCHETTE, P. ; GROITL, P. ; DOBNER, T.: Proteasome-dependent degradation of Daxx by the viral E1B-55K protein in human adenovirus-infected cells. In: *J Virol* 84 (2010), S. 7029–7038
- [Scott und Goldsmith 1993] SCOTT, G. A. ; GOLDSMITH, L. A.: Homeobox genes and skin development: a review. In: *J Invest Dermatol* 101 (1993), S. 3–8
- [Scott *et al.* 1989] SCOTT, M. P. ; TAMKUN, J. W. ; HARTZELL 3RD, G. W.: The structure and function of the homeodomain. In: *Biochim Biophys Acta* 989 (1989), S. 25–48
- [Sena-Esteves *et al.* 1999] SENA-ESTEVEES, M. ; SAEKI, Y. ; CAMP, S. M. ; CHIOCCA, E. A. ; BREAKFIELD, X. O.: Single-step conversion of cells to retrovirus vector producers with herpes simplex virus-Epstein-Barr virus hybrid amplicons. In: *J Virol* 73 (1999), S. 10426–10439
- [Shen *et al.* 2006] SHEN, T. H. ; LIN, H. K. ; SCAGLIONI, P. P. ; YUNG, T. M. ; PANDOLFI, P. P.: The mechanisms of PML-nuclear body formation. In: *Mol Cell* 24 (2006), S. 331–339
-

- 
- [Shenk 2001] SHENK, T.: Adenoviridae: the viruses and their replication. In: *Virology* Bd. 2. 4. Auflage. New York : Lippincott-Raven, 2001, S. 2265–2300
- [Shenk *et al.* 1980] SHENK, T. ; JONES, N. ; COLBY, W. ; FOWLKES, D.: Functional analysis of adenovirus-5 host-range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cells. In: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 44 Pt 1 (1980), S. 367–375
- [Shiojima *et al.* 1996] SHIOJIMA, I. ; KOMURO, I. ; MIZUNO, T. ; AIKAWA, R. ; AKAZAWA, H. ; OKA, T. ; YAMAZAKI, T. ; YAZAKI, Y.: Molecular cloning and characterization of human cardiac homeobox gene CSX1. In: *Circ Res* 79 (1996), S. 920–929
- [Shiroki *et al.* 1984] SHIROKI, K. ; HASHIMOTO, S. ; SAITO, I. ; FUKUI, Y. ; KATO, H. ; SHIMOJO, H.: Expression of the E4 gene is required for establishment of soft-agar colony-forming rat cell lines transformed by the adenovirus 12 E1 gene. In: *J Virol* 50 (1984), S. 854–863
- [Shope und Hurst 1933] SHOPE, R. E. ; HURST, E. W.: Infectious Papillomatosis of Rabbits : with a Note on the Histopathology. In: *J Exp Med* 58 (1933), S. 607–624
- [Shuda *et al.* 2008] SHUDA, M. ; FENG, H. ; KWUN, H. J. ; ROSEN, S. T. ; GJOERUP, O. ; MOORE, P. S. ; CHANG, Y.: T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (2008), S. 16272–16277
- [Sieber und Dobner 2007] SIEBER, T. ; DOBNER, T.: Adenovirus type 5 early region 1B 156R protein promotes cell transformation independently of repression of p53-stimulated transcription. In: *J Virol* 81 (2007), S. 95–105
- [Smiley *et al.* 1990] SMILEY, J. K. ; YOUNG, M. A. ; FLINT, S. J.: Intranuclear location of the adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton protein. In: *J Virol* 64 (1990), S. 4558–4564
- [Smith und Johnson 1988] SMITH, D. B. ; JOHNSON, K. S.: Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. In: *Gene* 67 (1988), S. 31–40
- [Speck *et al.* 1999] SPECK, N. A. ; STACY, T. ; WANG, Q. ; NORTH, T. ; GU, T. L. ; MILLER, J. ; BINDER, M. ; MARIN-PADILLA, M.: Core-binding factor: a central player in hematopoiesis and leukemia. In: *Cancer Res* 59 (1999), S. 1789s–1793s
- [Speiseder 2006] SPEISEDER, T.: *Herstellung und Charakterisierung von E4orf3- und E4orf6-defekten Virusmutanten von Adenovirus Serotyp5*, Universität Regensburg, Diplomarbeit, 2006
- [Speiseder 2010] SPEISEDER, T.: *Genetische und Biochemische Analysen zur Funktion des viralen Proteins E4orf3/4 in lytischen Replikationszyklus vom humanen Adenovirus Typ5*, Universität Hamburg, Diss., 2010
- [Steeenga *et al.* 1998] STEEGENGA, W. T. ; RITECO, N. ; JOCHEMSEN, A. G. ; FALLAUX, F. J. ; BOS, J. L.: The large E1B protein together with the E4orf6 protein target p53 for active degradation in adenovirus infected cells. In: *Oncogene* 16 (1998), S. 349–357
- [Stracker *et al.* 2002] STRACKER, T. H. ; CARSON, C. T. ; WEITZMAN, M. D.: Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11-Rad50-NBS1 DNA repair complex. In: *Nature* 418 (2002), S. 348–352
- [Stracker *et al.* 2005] STRACKER, T. H. ; LEE, D. V. ; CARSON, C. T. ; ARAUJO, F. D. ; ORNELLES, D. A. ; WEITZMAN, M. D.: Serotype-specific reorganization of the Mre11 complex by adenoviral E4orf3 proteins. In: *J Virol* 79 (2005), S. 6664–5573
- [Stuurman *et al.* 1992] STUURMAN, N. ; DE GRAAF, A. ; FLOORE, A. ; JOSSO, A. ; HUMBEL, B. ; DE JONG, L. ; VAN DRIEL, R.: A monoclonal antibody recognizing nuclear matrix-associated nuclear bodies. In: *J Cell Science* 101 (1992), S. 773–784
- [Suzuki und Hemmati-Brivanlou 2000] SUZUKI, A. ; HEMMATI-BRIVANLOU, A.: *Xenopus* embryonic E2F is required for the formation of ventral and posterior cell fates during early embryogenesis. In: *Mol Cell* 5 (2000), S. 217–229
- [Szmuness 1978] SZMUNESS, W.: Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus: evidence for a causal association. In: *Prog Med Virol* 24 (1978), S. 40–69
-

- 
- [Täuber und Dobner 2001] TÄUBER, B. ; DOBNER, T.: Molecular regulation and biological function of adenovirus early genes: the E4 ORFs. In: *Gene* 278 (2001), S. 1–23
- [Täuber und Dobner 2001] TÄUBER, B. ; DOBNER, T.: Adenovirus early E4 genes in viral oncogenesis. In: *Oncogene* 20 (2001), S. 7847–7854
- [Taghli-Lamalle et al. 2008] TAGHLI-LAMALLE, O. ; HSIA, C. ; RONSHAUGEN, M. ; MCGINNIS, W.: Context-dependent regulation of Hox protein functions by CK2 phosphorylation sites. In: *Dev Genes Evol* 218 (2008), S. 321–332
- [Takahashi et al. 2004] TAKAHASHI, Y. ; LALLEMAND-BREITENBACH, V. ; ZHU, J. ; DE THE, H.: PML nuclear bodies and apoptosis. In: *Oncogene* 23 (2004), S. 2819–2824
- [Tavalai und Stamminger 2008] TAVALAI, N. ; STAMMINGER, T.: New insights into the role of the subnuclear structure ND10 for viral infection. In: *Biochim Biophys Acta* 1783 (2008), S. 2207–2221
- [Thebault et al. 2000] THEBAULT, S. ; GACHON, F. ; LEMASSON, I. ; DEVAUX, C. ; MESNARD, J. M.: Molecular cloning of a novel human I-mfa domain-containing protein that differently regulates human T-cell leukemia virus type I and HIV-1 expression. In: *J Biol Chem* 275 (2000), S. 4848–4857
- [Thomas et al. 2001] THOMAS, D. L. ; SCHAACK, J. ; VOGEL, H. ; JAVIER, R. T.: Several E4 region functions influence mammary tumorigenesis by human adenovirus type 9. In: *J Virol* 75 (2001), S. 557–568
- [Tomko et al. 1997] TOMKO, R. P. ; XU, R. ; PHILIPSON, L.: HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), S. 3352–3356
- [Topisirovic et al. 2003] TOPISIROVIC, I. ; CULJKOVIC, B. ; COHEN, N. ; PEREZ, J. M. ; SKRABANEK, L. ; BORDEN, K. L.: The proline-rich homeodomain protein, PRH, is a tissue-specific inhibitor of eIF4E-dependent cyclin D1 mRNA transport and growth. In: *Embo J* 22 (2003), S. 689–703
- [Trentin et al. 1962] TRENTIN, J. J. ; YABE, Y. ; TAYLOR, G.: The quest for human cancer viruses. In: *Science* 137 (1962), S. 835–841
- [Turelli et al. 2001] TURELLI, P. ; DOUCAS, V. ; CRAIG, E. ; MANGEAT, B. ; KLAGES, N. ; EVANS, R. ; KALPANA, G. ; TRONO, D.: Cytoplasmic recruitment of INI1 and PML on incoming HIV preintegration complexes: interference with early steps of viral replication. In: *Mol Cell* 7 (2001), S. 1245–1254
- [Ullman und Hearing 2008] ULLMAN, A. J. ; HEARING, P.: Cellular proteins PML and Daxx mediate an innate antiviral defense antagonized by the adenovirus E4 ORF3 protein. In: *J Virol* 82 (2008), S. 7325–7335
- [van Damme et al. 2010] VAN DAMME, E. ; LAUKENS, K. ; DANG, T. H. ; VAN OSTADE, X.: A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics. In: *Int J Biol Sci* 6 (2010), S. 51–67
- [van der Eb und Zantema 1992] VAN DER EB, A. J. ; ZANTEMA, A.: *Adenovirus oncogenesis. In: Malignant transformation by DNA viruses.* Weinheim : Doerfler, W. and Boehm, P., 1992
- [Vellinga et al. 2005] VELLINGA, J. ; VAN DER HEIJDT, S. ; HOEBEN, R. C.: The adenovirus capsid: major progress in minor proteins. In: *J Gen Virol* 86 (2005), S. 1581–1588
- [Vogelstein et al. 1989] VOGELSTEIN, B. ; FEARON, E. R. ; KERN, S. E. ; HAMILTON, S. R. ; PREISINGER, A. C. ; NAKAMURA, Y. ; WHITE, R.: Allelotype of colorectal carcinomas. In: *Science* 244 (1989), S. 207–211
- [Vojtesek et al. 1992] VOJTESEK, B. ; BARTEK, J. ; MIDGLEY, C. A. ; LANE, D. P.: An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. In: *J Immunol Methods* 151 (1992), S. 237–244
- [Wadell 1984] WADELL, G.: Molecular epidemiology of human adenoviruses. In: *Curr Top Microbiol Immunol* 110 (1984), S. 191–220
-

- 
- [Wang *et al.* 1999] WANG, W. ; RIEDEL, K. ; LYNCH, P. ; CHIEN, C. Y. ; MONTELLIONE, G. T. ; KRUG, R. M.: RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic amino acids. In: *Rna* 5 (1999), S. 195–205
- [Weatherbee *et al.* 1998] WEATHERBEE, S. D. ; HALDER, G. ; KIM, J. ; HUDSON, A. ; CARROLL, S.: Ultrabithorax regulates genes at several levels of the wing-patterning hierarchy to shape the development of the *Drosophila* haltere. In: *Genes Dev* 12 (1998), S. 1474–1482
- [Weiden und Ginsberg 1994] WEIDEN, M. D. ; GINSBERG, H. S.: Deletion of the E4 region of the genome produces adenovirus DNA concatemers. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (1994), S. 153–157
- [Weigel und Dobbelstein 2000] WEIGEL, S. ; DOBBELSTEIN, M.: The nuclear export signal within the E4orf6 protein of adenovirus type 5 supports virus replication and cytoplasmic accumulation of viral mRNA. In: *J Virol* 74 (2000), S. 764–772
- [Weinberg und Ketner 1983] WEINBERG, D. H. ; KETNER, G.: A cell line that supports the growth of a defective early region 4 deletion mutant of human adenovirus type 2. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 80 (1983), S. 5383–5386
- [Weinberg und Ketner 1986] WEINBERG, D. H. ; KETNER, G.: Adenoviral early region 4 is required for efficient viral DNA replication and for late gene expression. In: *J Virol* 57 (1986), S. 833–838
- [White 1993] WHITE, E.: Regulation of apoptosis by the transforming genes of the DNA tumor virus adenovirus. In: *Proc Soc Exp Biol Med* 204 (1993), S. 30–39
- [White 1998] WHITE, E.: Regulation of apoptosis by adenovirus E1A and E1B oncoproteins. In: *Semin Virol* 8 (1998), S. 505–513
- [White 2001] WHITE, E.: Regulation of the cell cycle and apoptosis by the oncogenes of adenovirus. In: *Oncogene* 20 (2001), S. 7836–7846
- [Whittaker *et al.* 1984] WHITTAKER, J. L. ; BYRD, P. J. ; GRAND, R. J. ; GALLIMORE, P. H.: Isolation and characterization of four adenovirus type 12-transformed human embryo kidney cell lines. In: *Mol Cell Biol* 4 (1984), S. 110–116
- [Wickham *et al.* 1994] WICKHAM, T. J. ; FILARDO, E. J. ; CHERESH, D. A. ; NEMEROW, G. R.: Integrin alpha v beta 5 selectively promotes adenovirus mediated cell membrane permeabilization. In: *J Cell Biol* 127 (1994), S. 257–264
- [Williams *et al.* 1995] WILLIAMS, J. ; WILLIAMS, M. ; LIU, C. ; TELLING, G.: Assessing the role of E1A in the differential oncogenicity of group A and group C human adenoviruses. In: *Curr Top Microbiol Immunol* 199 (1995), S. 149–175
- [Wimmer 2010] WIMMER, P.: *Analysis of the modulation of nuclear domains by human adenovirus type 5 oncoproteins*, Universität Hamburg, Diss., 2010
- [Wimmer *et al.* 2010a] WIMMER, P. ; SCHREINER, S. ; EVERETT, R. D. ; SIRMA, H. ; GROITL, P. ; DOBNER, T.: SUMO modification of E1B-55K oncoprotein regulates isoform-specific binding to the tumour suppressor protein PML. In: *Oncogene* 29 (2010), S. 5511–5522
- [Wimmer *et al.* 2010b] WIMMER, P. ; TÄUBER, B. ; SPRUSS, T. ; DOBNER, T.: Adenovirus type 5 early encoded proteins of the E1 and E4 regions induce oncogenic transformation of primary rabbit cells. In: *J Gen Virol* 91 (2010), S. 1828–1833
- [Wold *et al.* 1999] WOLD, W. S. M. ; DORONIN, K. ; TOTH, K. ; KUPPUSWAMY, M. ; LICHTENSTEIN, D. L. ; TOLLEFSON, A. E.: Immune responses to adenoviruses: viral evasion mechanisms and their implications for the clinic. In: *Curr Opin Immunol* 11 (1999), S. 380–386
- [Wold und Horwitz 2007] WOLD, W. S. M. ; HORWITZ, M. S.: Adenoviruses. In: *Virology*. 5. Auflage. New York : Lippincott Williams & Wilkins, 2007
- [Wold *et al.* 1979] WOLD, W. S. M. ; MACKEY, J. K. ; RIGDEN, P. ; GREEN, M.: Analysis of human cancer DNA's for DNA sequence of human adenovirus serotypes 3, 7, 11, 14, 16, and 21 in group B1. In: *Cancer Res* 39 (1979), S. 3479–3484
-

- 
- [Woo und Berk 2007] WOO, J. L. ; BERK, A. J.: Adenovirus ubiquitin-protein ligase stimulates viral late mRNA nuclear export. In: *J Virol* 81 (2007), S. 575–587
- [Woodhall *et al.* 2006] WOODHALL, D. L. ; GROVES, I. J. ; REEVES, M. B. ; WILKINSON, G. ; SINCLAIR, J. H.: Human Daxx-mediated repression of human cytomegalovirus gene expression correlates with a repressive chromatin structure around the major immediate early promoter. In: *J Biol Chem* 281 (2006), S. 37652–37660
- [Wu *et al.* 2001] WU, G. J. ; CHEN, L. Y. ; DAI, G.: [Influence of human cytomegalovirus infection on the expression of HOXB5, HOXB6, HOXB7, and HOXB8 genes in gliomaous cells]. In: *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 26 (2001), S. 409–411
- [Wu *et al.* 2006] WU, X. ; CHEN, H. ; PARKER, B. ; RUBIN, E. ; ZHU, T. ; LEE, J. S. ; ARGANI, P. ; SUKUMAR, S.: HOXB7, a homeodomain protein, is overexpressed in breast cancer and confers epithelial-mesenchymal transition. In: *Cancer Res* 66 (2006), S. 9527–9534
- [Yang *et al.* 2000] YANG, Y. ; HWANG, C. K. ; D'SOUZA, U. M. ; LEE, S. H. ; JUNN, E. ; MOURADIAN, M. M.: Three-amino acid extension loop homeodomain proteins Meis2 and TGIF differentially regulate transcription. In: *J Biol Chem* 275 (2000), S. 20734–20741
- [Yaron *et al.* 2001] YARON, Y. ; MCADARA, J. K. ; LYNCH, M. ; HUGHES, E. ; GASSON, J. C.: Identification of novel functional regions important for the activity of HOXB7 in mammalian cells. In: *J Immunol* 166 (2001), S. 5058–5067
- [Yekta *et al.* 2004] YEKTA, S. ; SHIH, I. H. ; BARTEL, D. P.: MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. In: *Science* 304 (2004), S. 594–596
- [Yew *et al.* 1994] YEW, P. R. ; LIU, X. ; BERK, A. J.: Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. In: *Genes Dev* 8 (1994), S. 190–202
- [Yokouchi *et al.* 1995] YOKOUCHI, Y. ; NAKAZATO, S. ; YAMAMOTO, M. ; GOTO, Y. ; KAMEDA, T. ; IBA, H. ; KUROIWA, A.: Misexpression of Hoxa-13 induces cartilage homeotic transformation and changes cell adhesiveness in chick limb buds. In: *Genes Dev* 9 (1995), S. 2509–2522
- [Zhang und Nei 1996] ZHANG, J. ; NEI, M.: Evolution of Antennapedia-class homeobox genes. In: *Genetics* 142 (1996), S. 295–303
- [Zhang *et al.* 1997] ZHANG, L. ; WANG, H. ; LIU, D. ; LIDDINGTON, R. ; FU, H.: Raf-1 kinase and exoenzyme S interact with 14-3-3zeta through a common site involving lysine 49. In: *J Biol Chem* 272 (1997), S. 13717–13724
- [Zhong *et al.* 2000a] ZHONG, S. ; MÜLLER, S. ; RONCHETTI, S. ; FREEMONT, P. S. ; DEJEAN, A. ; PANDOLFI, P. P.: Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. In: *Blood* 95 (2000), S. 2748–2752
- [Zhong *et al.* 2000b] ZHONG, S. ; SALOMONI, P. ; PANDOLFI, P. P.: The transcriptional role of PML and the nuclear body. In: *Nat Cell Biol* 2 (2000), S. E85–90
- [zur Hausen *et al.* 1974] ZUR HAUSEN, H. ; MEINHOF, W. ; SCHEIBER, W. ; BORNKAMM, G. W.: Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. In: *Int J Cancer* 13 (1974), S. 650–656

---

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Dobner recht herzlich danken, dass er mir die Möglichkeit bot, diese Dissertation in seiner Abteilung anzufertigen. Ich danke ihm für die wissenschaftliche Anleitung der Arbeit sowie seine Unterstützung und sein Engagement.

Herrn Prof. Dr. Wolfram Brune danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Mühlbach und Herrn Dr. Andreas Pommereining-Röser für ihre Bereitschaft, die Funktion der Disputationsgutachter zu übernehmen. Weiterhin danke ich dem Prüfungsvorsitzenden Herrn Prof. Dr. Michael Böttger sowie allen Fragestellern der Disputationsprüfung.

Für die Hilfe bei der Durchführung des Hefe-Zwei-Hybrid Experiments danke ich Herrn Dr. Michael Winkler recht herzlich.

Marcel Krepstakies danke ich für die Durchführung des p24 ELISA.

Weiterhin gilt mein Dank allen Kolleginnen und -kollegen für die Bereitstellung von Reagenzien und ihre Unterstützung. Peter Groitl danke ich für seine Hilfe bei Klonierungen, die einfach nicht klappen wollten. Besonderer Dank gilt Sabrina Schreiner für das Korrekturlesen dieser Arbeit und ihre Hilfe und Tipps. Ebenso möchte ich mich bei Peter Wimmer für die gemeinsame Arbeit am PML Projekt bedanken. Den Mädels aus der „Weiselzelle“, besonders Melli, danke ich für angeregte Gespräche über „Gott und die Welt“.

Meiner Familie, besonders meiner Mutter, möchte ich ganz herzlich danken, dass sie immer für mich da ist und mich stets unterstützt. Bei Dennis möchte ich mich für die gemeinsamen zehn, besonders für die letzten vier Jahre bedanken, in denen er mir immer zur Seite stand und entscheidend dazu beitrug, dass diese Arbeit abgeschlossen wurde. Auch bei meinen Freunden möchte ich mich bedanken, dass sie mich unterstützt haben und mir den nötigen Ausgleich zum Laboralltag boten.