

# **Transformation humaner Primärzellen durch adenovirale Onkogene**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

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

vorgelegt von  
Natascha Kömm

Hamburg, im April 2011

Disputation: 03. Juni 2011

Erster Dissertationsgutachter: Prof. Dr. Thomas Dobner

Zweiter Dissertationsgutachter: Prof. Dr. Wolfram Brune

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: 03. Juni 2011

Hamburg, den 19. Mai 2011

  
Professor Dr. Axel Temming  
Leiter des Fachbereichs Biologie

*Für meine Familie*

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>0</b>
<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>4</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>7</b>
<b>2. EINLEITUNG</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1. Adenoviren</b> .....	<b>9</b>
2.1.1. Klassifikation .....	9
2.1.2. Klinische Relevanz humaner Adenoviren.....	9
2.1.3. Struktur und Genomorganisation .....	10
2.1.4. Lytische Infektion .....	12
2.1.5. Persistente/latente Infektion .....	14
<b>2.2. Virale Onkogenese</b> .....	<b>14</b>
2.2.1. Klassisches Modell der viralen Onkogenese.....	15
2.2.2. „Hit & Run“-Modell der viralen Onkogenese.....	16
<b>2.3. Onkogenität humaner Adenoviren</b> .....	<b>17</b>
2.3.1. Transformation von Nagetierzellen <i>in vitro</i> .....	18
2.3.2. Transformation von humanen Zellen <i>in vitro</i> .....	19
2.3.3. Funktion adenoviraler Onkoproteine .....	19
<b>2.4. Aufgabenstellung</b> .....	<b>24</b>
<b>3. MATERIAL</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1. Bakterien</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2. Säugerzellen</b> .....	<b>26</b>
<b>3.3. Nukleinsäuren</b> .....	<b>27</b>
3.3.1. Oligonukleotide .....	27
3.3.2. Vektoren .....	28
3.3.3. Rekombinante Plasmide .....	28
<b>3.4. Antikörper</b> .....	<b>29</b>
3.4.1. Primärantikörper.....	29
3.4.2. Sekundärantikörper .....	30
<b>3.5. Größen- und Molekulargewichtsstandards</b> .....	<b>30</b>
<b>3.6. Kommerzielle Systeme</b> .....	<b>30</b>
<b>3.7. Enzyme, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>31</b>
<b>3.8. Tiere</b> .....	<b>31</b>
<b>3.9. Computerprogramme und Datenbanken</b> .....	<b>31</b>
<b>4. METHODEN</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1. Bakterien</b> .....	<b>32</b>
4.1.1. Kulturbedingungen und Lagerung von Bakterien ( <i>E. coli</i> ).....	32
<b>4.2. Säugerzellen</b> .....	<b>33</b>
4.2.1. Kulturbedingungen und Lagerung von Säugerzellen.....	33
4.2.2. Bestimmung der Gesamtzellzahl.....	39
<b>4.3. Lentivirale Vektoren</b> .....	<b>39</b>
4.3.1. Herstellung und Lagerung rekombinanter lentiviraler Partikel.....	39

4.3.2. Bestimmung des lentiviralen Titers.....	41
4.3.3. Infektion von Säugerzellen mit lentiviralen Partikeln.....	41
4.3.4. Transformation primärer Zellen und Etablierung stabil transformierter Zelllinien	42
<b>4.4. DNA-Techniken .....</b>	<b>43</b>
4.4.1. Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	43
4.4.2. Präparation von genomischer DNA aus Säugerzellen .....	44
4.4.3. Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA .....	44
4.4.4. Agarose-Gelelektrophorese .....	45
4.4.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	45
4.4.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	46
4.4.7. Klonierung von DNA-Fragmenten.....	47
4.4.8. DNA-Sequenzierung .....	49
<b>4.5. Protein-Techniken .....</b>	<b>49</b>
4.5.1. Gesamtzellextrakt aus Säugerzellen.....	49
4.5.2. Bestimmung der Konzentration von Proteinen .....	50
4.5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	50
4.5.4. <i>Western Blot</i> .....	52
4.5.5. Immunfluoreszenzmarkierung .....	53
4.5.6. Immunologischer Nachweis extrazellulärer Marker an vitalen Zellen .....	54
<b>4.6. <i>Telomeric Repeat Amplification Protocol</i> (TRAP).....</b>	<b>55</b>
<b>4.7. Zytogenetische Analyse humaner Zellen.....</b>	<b>55</b>
<b>4.8. Tumorigenitätstest transformierter Zellklone in Nacktmäusen .....</b>	<b>55</b>
<b>5. ERGEBNISSE .....</b>	<b>57</b>
<b>5.1. Etablierung eines lentiviralen Vektorsystems zur Transduktion adenoviraler Onkogene.....</b>	<b>57</b>
<b>5.2. Transformationsexperimente an primären Nierenzellen neugeborener Ratten ...</b>	<b>59</b>
5.2.1. Die lentivirale Transduktion der Onkogene E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 resultiert in einer hohen Transformationseffizienz von BRK-Zellen.....	59
5.2.2. Die Transduktion verschiedener Kombinationen der Onkogene E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 hat unterschiedlich hohe Transformationsraten von BRK-Zellen zur Folge.....	62
<b>5.3. Transformationsexperimente an primären humanen Amniozyten.....</b>	<b>63</b>
5.3.1. Die Transduktion der Onkogene E1A und E1B-55K führt zur morphologischen Transformation von Amniozyten .....	64
5.3.2. Aus Kulturen transformierter Amniozyten sind monoklonale AB-Zelllinien isolierbar.....	65
5.3.3. Die transformierten AB-Zellklone exprimieren die transduzierten Onkogene und zeigen eine veränderte Wachstumsrate .....	66
5.3.4. Spezifische Kulturbedingungen erlauben die Isolierung mesenchymaler Stromazellen aus der Mischpopulation von Amniozyten .....	69
5.3.5. Die Transduktion der Onkogene E1A und E1B-55K führt zur morphologischen Transformation der isolierten mesenchymalen Stromazellen .....	70
<b>5.4. Transformationsexperimente an primären humanen mesenchymalen Stromazellen aus dem Knochenmark.....</b>	<b>72</b>
5.4.1. Die kommerziell erworbenen mesenchymalen Stromazellen weisen alle zelltypischen Charakteristika auf .....	72

5.4.2. Die Transduktion der Onkogene E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 führt zur morphologischen Transformation von mesenchymalen Stromazellen .....	76
5.4.3. Aus Kulturen transformierter mesenchymaler Stromazellen sind monoklonale AB-Zelllinien isolierbar .....	80
5.4.4. Die transformierten AB-Zellklone exprimieren die transduzierten Onkogene.....	81
5.4.5. Die transformierten AB-Zellklone zeigen eine veränderte Wachstumsrate.....	86
5.4.6. Die transformierten AB-Zellklone zeigen erhöhte Telomeraseaktivität .....	87
5.4.7. Die transformierten AB-Zellklone zeigen kein tumorigenes Potenzial in Nacktmäusen .....	89
5.4.8. Die transformierten AB-Zellklone zeigen einen veränderten Chromosomenstatus .....	90
<b>6. DISKUSSION .....</b>	<b>93</b>
<b>6.1. Transformationspotenzial und Onkogenität humaner Adenoviren.....</b>	<b>93</b>
<b>6.2. Die lentivirale Transduktion adenoviraler Onkogene ist eine funktionale und hoch effiziente Methode zur <i>in vitro</i>-Transformation von Säugierzellen.....</b>	<b>94</b>
<b>6.3. Die gemeinsame stabile Expression von E1A und E1B-55K ist Voraussetzung für eine effiziente <i>in vitro</i>-Transformation von Säugierzellen.....</b>	<b>95</b>
<b>6.4. Das transformationsverstärkende Potenzial von E4orf3 und E4orf6 in Säugierzellen scheint auf ihrer transienten Anwesenheit zu beruhen.....</b>	<b>96</b>
<b>6.5. Die stabile Expression von E1A und E1B-55K in Amniozyten und mesenchymalen Stromazellen resultiert in stabil wachsenden Kulturen morphologisch transformierter Zellklone.....</b>	<b>97</b>
<b>6.6. Die morphologische Transformation von mesenchymalen Stromazellen durch E1A und E1B-55K geht mit erhöhter Telomeraseaktivität einher.....</b>	<b>98</b>
<b>6.7. Durch E1A und E1B-55K morphologisch transformierte mesenchymale Stromazellen zeigen chromosomale Aberrationen, nicht aber tumorigenes Potenzial in Nacktmäusen.....</b>	<b>99</b>
<b>6.8. Ausblick.....</b>	<b>100</b>
<b>LITERATUR .....</b>	<b>102</b>
<b>ANHANG .....</b>	<b>115</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>125</b>

## ABKÜRZUNGEN

AF	<i>amniotic fluid</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BFP	<i>blue fluorescent protein</i>
bp	Basenpaare
BRG	Blasticidinresistenzgen
BRK	<i>baby rat kidney cells</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CMV	Cytomegalievirus
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DBP	DNA-bindendes Protein
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	<i>early</i>
E2F	<i>transcription factor activating adenovirus E2 gene</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF4F	<i>eukaryotic initiation factor 4F</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fwd	<i>forward</i>
<i>gag</i>	<i>group specific antigen</i>
GOI	<i>gene of interest</i>
HAdV5	Humanes Adenovirus Typ 5
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEK	<i>human embryonic kidney cells</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER	<i>human embryonic retinoblasts</i>
HHV-8	Humanes Herpesvirus 8
HIV-1	Humanes Immundefizienzvirus 1
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
hMSC	<i>human mesenchymal stromal cells</i>

hpi	<i>hours post infection</i>
HPV	Humanes Papillomvirus
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSV	Herpes-Simplex-Virus
hTERT	<i>human telomerase reverse transcriptase</i>
HTLV-1	Humanes T-lymphotrophes Virus 1
IgG	Immunglobulin G (Gammaglobulin)
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
ISCT	International Society for Cellular Therapy
ITR	<i>inverted terminal repeat</i>
kb	Kilobasenpaare
KSHV	Kaposi-Sarkom-Herpesvirus
L	<i>late</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LeGO	<i>lentiviral gene ontology</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	molar
MCPyV	Merkel-Zell-Polyomavirus
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MLP	<i>major late promotor</i>
MLTU	<i>major late transcription unit</i>
MRN	Mre11-Rad50-Nbs1
mRNA	<i>messenger RNA</i>
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
orf	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PML NB	<i>promyelocytic leukemia nuclear body</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>pol</i>	<i>polymerase</i>
pRb	Retinoblastomprotein
R	Aminosäurerest
Rbx1	<i>RING-box protein 1</i>
rev	<i>reverse</i>
<i>rev</i>	<i>reverse transcriptase</i>
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
S	Sedimentationskoeffizient
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFFV	<i>Spleen focus-forming virus</i>
SIN-LTR	<i>self-inactivating long terminal repeat</i>
sSMC	<i>small supernumerary marker chromosome</i>
SV40	<i>Simian virus 40</i>

<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBS-BG	TBS mit BSA und Glyzin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGS	Tris-Glyzin-SDS
Thy-1	<i>thymocyte differentiation antigen 1</i>
TP	terminales Protein
TPL	<i>tripartite leader</i>
TRAP	<i>telomeric repeat amplification protocol</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i>
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
VA RNA	virusassoziierte RNA
VSV	<i>Vesicular stomatitis virus</i>

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

Seit Jahrzehnten ist bekannt, dass humane Adenoviren onkogenes Potenzial im Tiermodell besitzen. Für einen Zusammenhang zwischen Adenovirusinfektionen und Tumorerkrankungen beim Menschen gibt es hingegen bislang nur wenige Hinweise. Besonders der Nachweis adenoviraler DNA im menschlichen Tumorgewebe unterstützt jedoch die Vermutung, dass humane Adenoviren mit bestimmten Tumorerkrankungen des Menschen assoziiert sein könnten. Die Onkogenität humaner Adenoviren wie HAdV5 (Humanes Adenovirus Typ 5) der Spezies C wird vor allem auf die Funktionen der viralen Onkogene E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 zurückgeführt, die im Rahmen der viralen Replikation zum Zwecke einer effizienten Virusvermehrung Zellzyklusprogression, Apoptose- und Seneszenzmechanismen sowie DNA-Reparatur der Wirtszelle beeinflussen. *In vitro* kann eine Transformation von Zellen durch die Expression dieser Onkogene erreicht werden, die in der Regel durch Plasmidtransfektion vermittelt wird. Dieses wurde in früheren Studien vor allem in Experimenten an Nagetierzellen erzielt, wogegen die Transformation humaner Zellen bisher nur sehr selten gelungen ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die *in vitro*-Transformation humaner Primärzellen erfolgreich durchgeführt. Dazu kam ein lentivirales Vektorsystem zum Einsatz, in dem die adenoviralen Onkogene E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 (HAdV5) individuell kodiert waren. Durch die lentivirale Transduktion der Onkogene wurde im Gegensatz zu den Transfektionsexperimenten früherer Arbeiten ihre stabile Expression in den Zielzellen erreicht. Dieses System wurde zunächst in Transformationsexperimenten an primären Nierenzellen neugeborener Ratten (BRK-Zellen) getestet, wobei insbesondere die stabile Expression von E1A und E1B-55K in einer hohen Transformationsrate der Zellen resultierte, während die stabile Expression von E4orf3 und E4orf6 den Transformationsprozess zu hemmen schien. Auf der Basis früherer Studien wurden die Transformationsexperimente im Humansystem an primären Amniozyten (Fruchtwasserzellen) durchgeführt, die sich durch lentivirale Transduktion von E1A und E1B-55K ebenfalls morphologisch transformierbar zeigten. Monoklonal isolierte morphologisch transformierte Amniozyten konnten stabil kultiviert werden und zeigten sowohl die Integration der transduzierten Onkogene als auch deren Expression. Da Amniozyten eine Mischpopulation verschiedener Zelltypen darstellen und die adenoviral transformierbare Zellspezies innerhalb dieser Population unbekannt war,

wurden aus dem Fruchtwasser isolierte humane mesenchymale Stromazellen (hMSC) sowie kommerziell erworbene hMSC aus dem Knochenmark in weiteren Transformationsexperimenten eingesetzt. Da auch diese Zellen erfolgreich durch die Transduktion adenoviraler Onkogene morphologisch transformiert werden konnten, ist es denkbar, dass jene Progenitorzellspezies präferenziell adenoviral transformierbar sein könnte. Im Hinblick auf die in früheren Arbeiten gezeigte adenoviral induzierte Entstehung von Sarkomen in Nagern ist dieser Befund überaus interessant, da solche Tumore aus mesenchymalen Stromazellen hervorgehen. Bei der Charakterisierung monoklonal isolierter Kulturen morphologisch transformierter hMSC, die aus der Transduktion von E1A und E1B-55K resultierten, zeigte sich neben der Integration und Expression der beiden Onkogene auch ein beschleunigtes Zellwachstum im Falle einiger Klone. Darüber hinaus wurden in denselben Klonen erhöhte Telomeraseaktivität sowie komplexe chromosomale Veränderungen nachgewiesen, typische Charakteristika von onkogen transformierten Zellen bzw. Tumorzellen, was ein weiteres hochinteressantes Ergebnis darstellt.

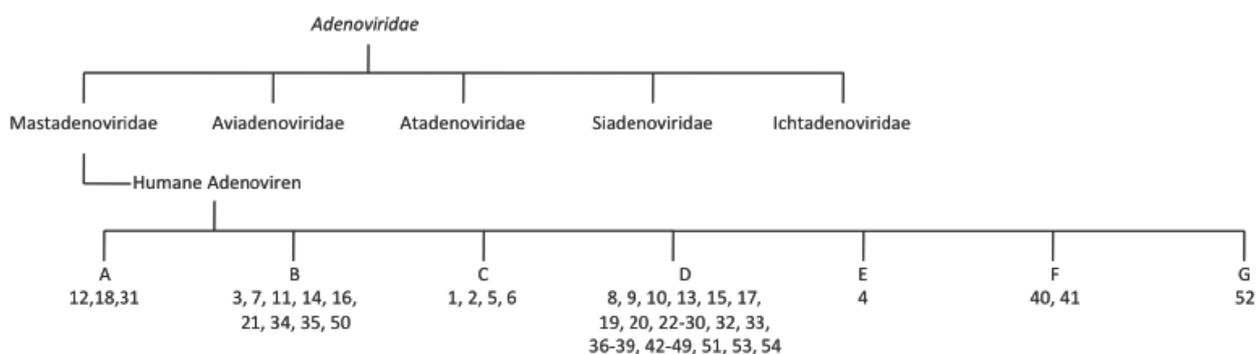
Insgesamt unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Hypothese, dass abortive Adenovirusinfektionen in humanen Zellen einen Transformationsprozess und damit eine Onkogenese nach sich ziehen können. Die in dieser Arbeit untersuchten mesenchymalen Stromazellen, die in vielen Organen des menschlichen Organismus zu finden sind, könnten dabei eine präferenziell adenoviral transformierbare Zellspezies darstellen. Insbesondere eine stabile Expression von E1A und E1B-55K im Rahmen einer persistenten oder latenten Adenovirusinfektion kann den vorliegenden Daten zufolge zu einer Dysregulation der Zellzykluskontrolle und der Apoptose, zu einer Erhöhung der Telomeraseaktivität sowie zur Akkumulierung chromosomaler Instabilität führen und damit möglicherweise die Onkogenese der betroffenen Zellen induzieren oder unterstützen.

## 2. EINLEITUNG

### 2.1. Adenoviren

#### 2.1.1. Klassifikation

Adenoviren konnten erstmals zu Beginn der fünfziger Jahre aus adenoidem Gewebe und Rachensekret respiratorisch erkrankter Patienten isoliert werden (Hilleman and Werner, 1954; Rowe *et al.*, 1953). Heute umfasst die Familie der *Adenoviridae* mehr als 100 serologisch unterscheidbare Virustypen, die in die fünf Gattungen Mastadenoviren, Aviadenoviren, Atadenoviren, Siadenoviren und Ichtadenoviren unterteilt werden. Die humanen Adenoviren, die der Gattung *Mastadenoviridae* zugeordnet werden, unterscheidet man aufgrund verschiedener Kriterien wie Sequenzhomologie, Hämagglutination sowie ihrem onkogenen Potenzial in immunsupprimierten Versuchstieren in 54 Virustypen, die in sieben Spezies A bis G unterteilt werden (Abbildung 1) (Davison *et al.*, 2003).



**Abb. 1: Klassifikation humaner Adenoviren**

Die zur Gattung der *Mastadenoviridae* gehörigen humanen Adenoviren sind mit ihren 54 Virustypen in die Spezies A bis G unterteilt (Davison *et al.*, 2003).

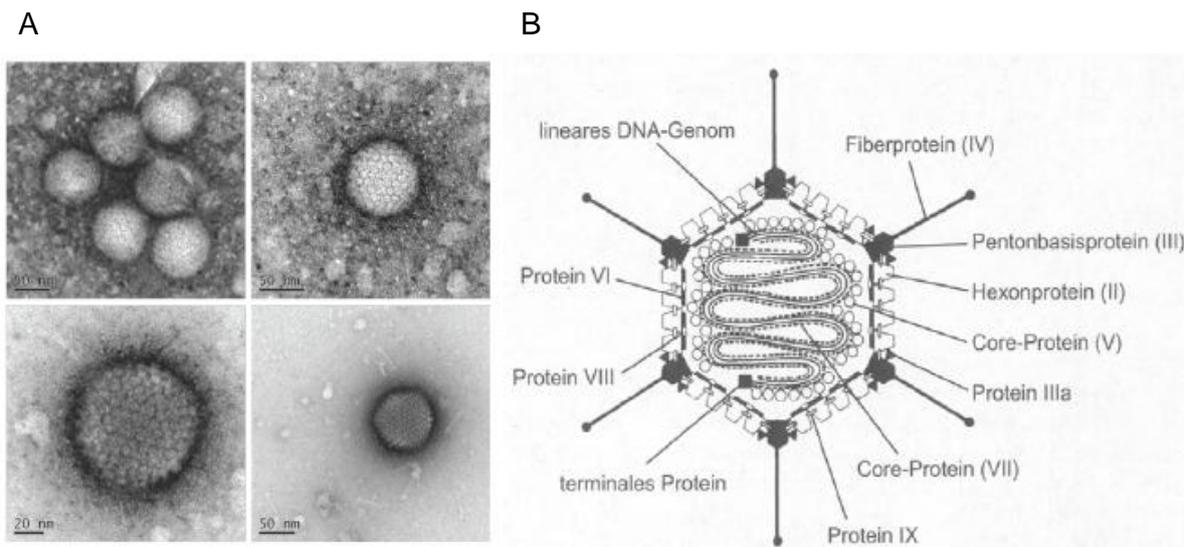
#### 2.1.2. Klinische Relevanz humaner Adenoviren

Humane Adenoviren sind weltweit mit hoher Prävalenz verbreitet und mit einer Vielzahl klinischer Symptome assoziiert. Sie sind in der Lage, sowohl lytische als auch persistierende Infektionen zu verursachen. Adenoviren rufen hauptsächlich Erkrankungen des

Respirationstraktes, des Gastrointestinaltraktes und des Auges hervor, können jedoch auch in Abhängigkeit vom Virustyp andere Organe wie die Blase, die Leber, den Herzmuskel und das Zentralnervensystem befallen (Wold and Horwitz, 2007). Adenovirusinfektionen treten meist schon im frühen Kindesalter auf und können von einem intakten Immunsystem generell gut eliminiert werden. Anders ist die Situation bei Patienten mit geschwächtem Immunsystem (z. B. nach Knochenmarktransplantationen oder bei HIV-positiven Personen), bei denen Adenovirusinfektionen besondere Komplikationen hervorrufen können, wobei häufig disseminierte Erkrankungen mit letalem Verlauf beschrieben werden (Abe *et al.*, 2003; Wold and Horwitz, 2007). Interessanterweise wird seit einiger Zeit auch vermutet, dass Fettleibigkeit beim Menschen mit HAdV36 assoziiert sein könnte (Atkinson *et al.*, 2005).

### **2.1.3. Struktur und Genomorganisation**

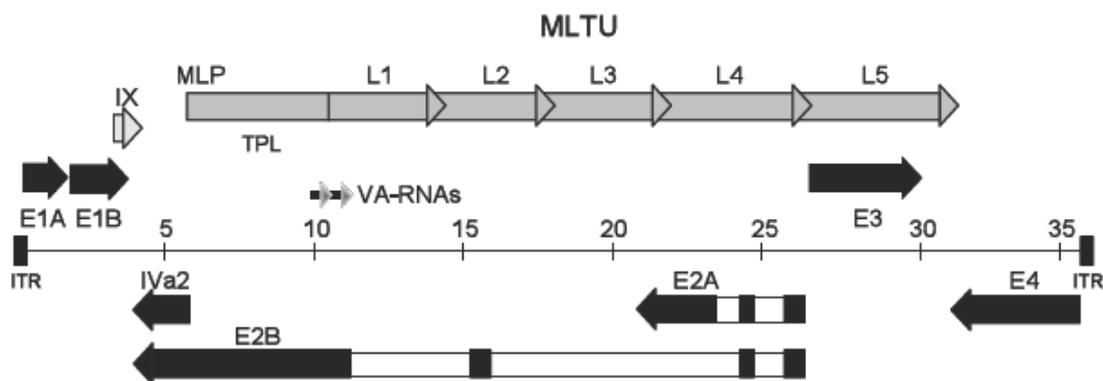
Adenoviren bestehen aus einem 80 bis 110 nm großen ikosaedrischen Proteinkapsid ohne Membranhülle und enthalten ein doppelsträngiges lineares DNA-Genom. Das virale Kapsid besteht aus 240 trimeren Hexonen sowie 12 Pentonen (Stewart *et al.*, 1993). Die Pentone sind nicht-kovalent mit Fiberproteinen verknüpft und bilden damit die für die Adenoviren typischen antennenartigen Fortsätze (*spikes*), die die Virusadsorption an die Wirtszellrezeptoren ermöglichen (Abbildung 2). Der von den Adenoviren der Spezies C bevorzugte Rezeptor ist der Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) (Bergelson *et al.*, 1997). Bei den adenoviralen *core*-Proteinen unterscheidet man die mit dem Kapsid assoziierten Proteine (pIIIa, pVI, pVIII und pIX) (Vellinga *et al.*, 2005) sowie die mit dem Virusgenom assoziierten Proteine (pV, pVII, Mu, IVa2 und TP) (Russell, 2009). Zu den bis heute am ausführlichsten untersuchten Adenoviren gehört HAdV5 der Spezies C.



**Abb. 2: Struktur des Adenovirus**

A. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Viruspartikeln des HAdV5 mit einer deutlich erkennbaren ikosaedrischen Kapsidstruktur, welche vorwiegend aus Hexonproteinen besteht (Abteilung Elektronenmikroskopie, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg). B. Schematischer Aufbau eines Adenoviruspartikels (Modrow and Falke, 2002).

Das adenovirale Genom hat eine Größe von 26 bis 45 kb und wird an seinen Enden von invertierten Sequenzwiederholungen (ITR = *inverted terminal repeats*) flankiert. Darüber hinaus ist an den 5'-Enden beider DNA-Stränge das terminale Protein (TP) gebunden, welches für die Initiation der viralen DNA-Replikation benötigt wird (Davison *et al.*, 2003). Die Genomorganisation wird nachfolgend anhand des Beispiels von HAdV5 beschrieben und ist bei anderen Adenovirustypen ähnlich aufgebaut. Das Genom von HAdV5 enthält neun Transkriptionseinheiten, die für 40 verschiedene regulatorische und strukturelle Proteine sowie zwei virusassoziierte RNAs (VA RNAs) kodieren. Die Transkriptionseinheiten werden in die frühen (E = *early*; E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, pIX und IVa2) sowie die späten (MLTU = *major late transcription unit*; L1 bis L5) Einheiten unterteilt. Die späten Gene werden von einem gemeinsamen Promotor (MLP = *major late promotor*) aus transkribiert, so dass die entstehenden mRNAs immer das gleiche 5'-Ende besitzen, das als *tripartite leader-Sequenz* (TPL) bezeichnet wird. Während die frühen Transkriptionseinheiten bereits vor der DNA-Synthese aktiv sind und regulatorische Funktionen bezüglich DNA-Replikation, Modulation des Immunsystems sowie Transkription, RNA-Prozessierung und Zellzykluskontrolle besitzen, werden die späten Gene erst nach der DNA-Replikation transkribiert und kodieren hauptsächlich für virale Strukturproteine (Abbildung 3) (Shenk, 2001).



**Abb. 3: Die Genomorganisation von HAdV5**

Übersicht der frühen Gene (E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4, pIX und IVa2) und der späten Transkriptionseinheit MLTU, wobei die Pfeilrichtung die Transkriptionsrichtung auf den beiden kodierenden DNA-Strängen des Virusgenoms angibt. MLTU = *major late transcription unit*; MLP = *major late promotor*; TPL = *tripartite leader*; VA RNAs = *virus-associated RNAs*; ITR = *inverted terminal repeat* (Shenk, 2001).

#### 2.1.4. Lytische Infektion

Die bevorzugten Zielzellen humaner Adenoviren sind postmitotisch ruhende, terminal differenzierte Epithelzellen des Respirationstraktes und des Gastrointestinaltraktes. *In vitro* können humane Adenoviren sowohl in verschiedenen Tumorzelllinien als auch in Primärzellen vermehrt werden. Die lytische Infektion wird in eine frühe und eine späte Phase unterteilt.

In der frühen Phase der Infektion erfolgt nach Adsorption, Penetration und Kernimport des viralen Genoms die Transkription und Translation der frühen viralen Transkriptionseinheiten E1A, E1B, E2, E3 und E4 in zeitlich koordinierter Abfolge. Daraus resultieren über 20 regulatorische Proteine, deren Aufgabe die Schaffung optimaler Bedingungen für die späte Phase der Infektion ist. Vor allem der Eintritt ruhender Zellen in die S-Phase und die Zellzyklusprogression durch den Einfluss der E1A- und E1B-Proteine ist für die virale Replikation von zentraler Bedeutung, da nur in sich teilenden Zellen ausreichende Mengen von Molekülbausteinen für die Virusvermehrung zur Verfügung stehen. Zusätzlich werden durch E1B-, E3- und E4-Proteine verschiedene antivirale Mechanismen der Wirtszelle blockiert (Berk, 2005; Burgert *et al.*, 2002; Horwitz, 2001; McNees and Gooding, 2002). Die E2-Region kodiert für Faktoren, die für die virale DNA-Replikation benötigt werden, wie die virale DNA-Polymerase, das DNA-bindende Protein (DBP) sowie das terminale Protein (Shenk, 2001). Darüber hinaus tragen auch die E4-Proteine auf verschiedene Weise zu einer effizienten Virusreplikation bei (Tauber and Dobner, 2001b).



#### **Abb. 4: Lytischer Infektionszyklus humaner Adenoviren**

Nach der Adsorption des Virus an die Wirtszelle wird dieser mittels Endozytose aufgenommen und anschließend lysiert. Die virale DNA wird in den Zellkern importiert, und es kommt zunächst zur Expression und Aktivierung der frühen viralen Gene E1 bis E4. Während dieser Phase der Infektion wird die Zellzyklusprogression angetrieben, werden Apoptose- und Seneszenzmechanismen unterbunden, wird die Immunantwort der Zelle moduliert und die Lebensfähigkeit der Zelle wird aufrechterhalten. In der nächsten Phase der Infektion werden die späten viralen Gene L1 bis L5 exprimiert und aktiviert, wodurch DNA-Reparaturprozesse moduliert und der zelluläre mRNA-Transport sowie die zelluläre Proteinsynthese abgeschaltet werden. Darüber hinaus erfolgt die Assemblierung von Nachkommenviren, die schließlich durch Lyse der Wirtszelle freigesetzt werden. hpi = *hours post infection* (Flint, 2008).

#### **2.1.5. Persistente/latente Infektion**

Ähnlich wie andere humane Viren können auch humane Adenoviren persistierende Infektionen in ihren Wirtszellen etablieren und somit die Grundlage für eine potenzielle Virusreaktivierung bilden. Leider gibt es nur wenige Daten über persistierende Adenovirusinfektionen. Ferner ist bislang unklar, ob die virale DNA in diesem Falle wie in akuten Infektionen in episomaler Form persistiert und ob die frühen und späten Virusgene exprimiert werden oder nicht. In T-Lymphozyten kindlicher Tonsillen konnten jedoch latente Adenovirusinfektionen nachgewiesen werden, wobei sowohl frühe als auch späte Gene detektiert wurden (Garnett *et al.*, 2009). Diese Beobachtung legt nahe, dass offensichtlich das gesamte Virusgenom im untersuchten Material vorhanden war. Eine andere Arbeit zeigt die Persistenz von adenoviraler DNA sowie die Expression des E1A-Proteins in Lungenepithelzellen lange nach dem Abklingen aller klinischen Symptome einer Adenovirusinfektion (Elliott *et al.*, 1995). Ferner gibt es deutliche Hinweise für die Persistenz humaner Adenoviren im Zentralnervensystem, sowohl im Großhirn als auch in der Ependymschicht (Kosulin *et al.*, 2007). Darüber hinaus wird vermutet, dass humane Adenoviren auch im Gastrointestinaltrakt persistieren, was im Zusammenhang mit einer Virusreaktivierung in immunsupprimierten Patienten nach Transplantationen von großer Bedeutung sein könnte (Allard *et al.*, 1992; McLaughlin *et al.*, 2003). Der Mechanismus einer solchen Reaktivierung ist jedoch noch völlig unbekannt.

## **2.2. Virale Onkogenese**

Die Rolle infektiöser Agenzien in der Pathogenese menschlicher Krebserkrankungen war in den letzten Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung. Insbesondere Virusinfektionen scheinen dabei mit einer ganzen Reihe maligner Krankheitsbilder assoziiert zu sein (Tabelle

1) (Cathomas *et al.*, 1996; Farrell *et al.*, 1997; Gissmann *et al.*, 1982; Parkin, 2006; Poiesz *et al.*, 1980; Szmunness, 1978). Das tumorigene Potenzial von Viren beruht dabei wahrscheinlich auf virusvermittelter Immunsuppression sowie auf transformationsfördernden Eigenschaften viraler Onkoproteine (Grassmann *et al.*, 1989; Hawley-Nelson *et al.*, 1989). Zu den bekannten Beispielen von Viren, die mit Krebserkrankungen in Verbindung stehen, gehören unter anderem das Humane T-lymphotrophe Virus 1 (HTLV-1) (Poiesz *et al.*, 1980), die humanen Papillomviren (HPV) (Gissmann *et al.*, 1982; Hawley-Nelson *et al.*, 1989), das Hepatitis-B-Virus (HBV) (Szmunness, 1978) sowie das Epstein-Barr-Virus (EBV) (Farrell *et al.*, 1997). Ferner scheint nach jüngsten Erkenntnissen auch das Merkel-Zell-Polyomavirus (MCPyV) mit der Entstehung von Hauttumoren assoziiert zu sein (Feng *et al.*, 2008). Eine durch viralen Einfluss bedingte Tumorentstehung kann anhand zweier Modelle erklärt werden, dem klassischen Modell der viralen Onkogenese sowie dem „Hit & Run“-Modell der viralen Onkogenese (2.2.1. und 2.2.2).

**TABLE X – TOTAL INFECTION ATTRIBUTABLE CANCERS WORLDWIDE IN 2002: BY INFECTIOUS AGENT**

Agent	Cancer	Number of cases	% of all cancers
H. pylori	Stomach	592,000	5.5
	Lymphoma	11,500	
HPV	Cervix	492,800	5.2
	Ano-genital	53,880	
	Mouth, pharynx	14,500	
HBV and HCV	Liver	535,000	4.9
	Nasopharynx	78,100	
EBV	Hodgkin lymphoma	28,600	1.0
	Burkitt lymphoma	6,700	
	Kaposi sarcoma	66,200	
HIV/HHV-8	Non-Hodgkin lymphoma	36,100	0.9
	Bladder	10,600	
Schistosomes	ATL	3,300	0.03
Liver flukes	Liver	2,500	0.02
Total		1,932,800	17.8

**Tab. 1: Assoziation humaner Krebserkrankungen mit infektiösen Agenzien (weltweit im Jahr 2002)**

Fallzahlen humaner Krebserkrankungen, die einer Infektion zuzuordnen sind, sowie deren Anteil an der Gesamtzahl von Krebserkrankungen weltweit im Jahr 2002. HPV = Humanes Papillomvirus; HBV = Hepatitis-B-Virus; HCV = Hepatitis-C-Virus; EBV = Epstein-Barr-Virus; HIV = Humanes Immundefizienzvirus; HHV-8 = Humanes Herpesvirus 8 (auch KSHV = Kaposi-Sarkom-Herpesvirus); HTLV-1 = Humanes T-lymphotrophes Virus 1 (Parkin, 2006).

### 2.2.1. Klassisches Modell der viralen Onkogenese

Die Tumorentstehung ist ein mehrstufiger evolutionärer Prozess, in dem eine Selektion auf genetische und epigenetische Veränderungen stattfindet, die ein ungebremstes Wachstum der Tumorzellen ermöglichen. Dabei müssen verschiedene zelluläre Prozesse, vor allem aber die

Zellzykluskontrolle und Apoptose- bzw. Seneszenzmechanismen, dereguliert werden. Dies erfolgt häufig durch die Mutation der Tumorsuppressoren p53 und pRb (Hanahan and Weinberg, 2000). Humane Adenoviren und andere DNA-Tumoviren müssen im Rahmen ihres Replikationszyklus dieselben Kontrollmechanismen überwinden und erreichen dies häufig durch die Inaktivierung von p53 und pRb (Nevins and Vogt, 2007). Die Anwesenheit viraler Onkoproteine wirkt in der Transformation demnach ähnlich wie Mutationen in zellulären Protoonkogenen oder Tumorsuppressoren (Elgui de Oliveira, 2007; Scheffner *et al.*, 1991). Dies wird mit dem klassischen Modell der viralen Onkogenese beschrieben. Diesem Konzept zufolge resultiert die stabile Expression viraler Onkogene durch Integration ins Wirtszellgenom in einer Störung zellulärer Schlüsselfunktionen und damit in der Zelltransformation. Kommt es zum Verlust der viralen Onkogene, ist der transformierte Phänotyp vollständig reversibel (Nevins and Vogt, 2007).

### **2.2.2. „Hit & Run“-Modell der viralen Onkogenese**

Dem so genannten „Hit & Run“-Modell der viralen Onkogenese zufolge rufen mutagen wirkende virale Proteine in der Zelle Veränderungen hervor, die einen Transformationsprozess initiieren („hit“). Diese Faktoren können im weiteren Verlauf verloren gehen, ohne dass dies eine Reversion des transformierten Phänotyps nach sich zieht („run“). Durch die transiente Anwesenheit eines Mutagens hat dieser Prozess Ähnlichkeit mit der Transformation durch ionisierende Strahlung (Huang *et al.*, 2003; Morgan *et al.*, 1996). Ebenso wie ionisierende Strahlung können vermutlich auch humane Adenoviren und andere DNA-Tumoviren genomische Instabilität erzeugen (Elgui de Oliveira, 2007; Lavia *et al.*, 2003). Das „Hit & Run“-Modell der viralen Onkogenese konnte zwar noch nicht eindeutig bewiesen werden, jedoch wurden im Zusammenhang mit der Transformation durch unterschiedliche Viren wiederholt Beobachtungen gemacht, die diese These stützen. Neben humanen Adenoviren wurden in diesem Kontext auch verschiedene Herpesviren (HCMV, EBV, KSHV und HSV), Hepatitisviren (HBV und HCV) sowie Papillom- und Polyomaviren (SV40, BCV und JCV) genannt. Darüber hinaus wurde für diese Viren die Induktion genomischer Instabilität bzw. mutagenes Potenzial gezeigt (Ambinder, 2000; Barbanti-Brodano *et al.*, 2004; Elgui de Oliveira, 2007; Hessein *et al.*, 2005; Iwasaka *et al.*, 1992; Khalili *et al.*, 2003; Kuhlmann *et al.*, 1982; Lomonte and Morency, 2007; Machida *et al.*, 2004; Nevels *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 1997; Si and Robertson, 2006; Skinner, 1976; Tognon *et al.*, 2003).

### 2.3. Onkogenität humaner Adenoviren

Bereits im Jahr 1962 konnten kanzerogene Eigenschaften humaner Adenoviren im Tiermodell gezeigt werden. Nach Injektion von HAdV12 in neugeborene Hamster entwickelten die Tiere verschiedene Arten von Tumoren (Trentin *et al.*, 1962). Heute werden die humanen Adenoviren entsprechend ihres onkogenen Potenzials in drei Gruppen eingeteilt (Graham, 1984; Modrow and Falke, 2002; Nevins and Vogt, 2007). Zu den hoch onkogenen Adenoviren gehören die Viren der Spezies A, die in Nagern die Bildung von Sarkomen, neuroepithelialen, retinalen und adenomatösen Tumoren induzieren (Graham, 1984; Mukai and Bowers, 1975), sowie die Virustypen 9 und 10 der Spezies D, die in weiblichen Ratten Mammakarzinome verursachen (Ankerst and Jonsson, 1989; Ankerst *et al.*, 1974; Javier *et al.*, 1991; Jonsson and Ankerst, 1977). Adenoviren der Spezies B werden als schwach onkogen eingestuft, da sie nur unregelmäßig und nach langer Inkubationszeit Tumore in Nagern induzieren (Graham, 1984). Die Adenoviren der Spezies C gelten hingegen in Versuchstieren als nicht onkogen. Über die Spezies E, F und G liegen bisher keine genauen Daten hinsichtlich ihres onkogenen Potenzials vor.

Sowohl onkogene als auch nicht onkogene Adenoviren sind in der Lage, *in vitro* primäre Nagerzellen zu transformieren (Nevins and Vogt, 2007). Die Transformation primärer humaner Zellen in Zellkultur ist dagegen bis heute nur sehr selten gelungen, wobei es sich ausschließlich um embryonale Zellen handelte (2.3.2.) (Byrd *et al.*, 1982; Fallaux *et al.*, 1996; Gallimore *et al.*, 1986; Graham *et al.*, 1977; Schiedner *et al.*, 2000; Shaw *et al.*, 2002; van den Heuvel *et al.*, 1992; Whittaker *et al.*, 1984).

In den meisten adenoviral induzierten Tumoren, Tumorzelllinien und transformierten Zellklonen persistiert die virale DNA durch Integration in das Wirtszellgenom, so dass Virusproteine stabil exprimiert werden. Damit scheint die adenovirale Transformation überwiegend dem klassischen Modell der viralen Onkogenese zu folgen (Graham, 1984). In einigen Fällen wurde jedoch auch festgestellt, dass die ständige Anwesenheit und Expression adenoviraler Gene nicht zwangsläufig für die Aufrechterhaltung eines onkogenen Phänotyps verantwortlich ist (Kuhlmann *et al.*, 1982; Nevels *et al.*, 2001; Paraskeva *et al.*, 1982; Paraskeva and Gallimore, 1980; Pfeffer *et al.*, 1999). Diese Beobachtungen sprechen somit für einen Transformationsmechanismus nach dem „Hit & Run“-Modell der viralen Onkogenese.

Obwohl die Tumorigenität des Virus im Tiermodell bereits gut belegt ist, sind bislang nur wenige Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen humanen Adenoviren und Tumorerkrankungen beim Menschen vorhanden. Bei der Untersuchung kleinzelliger Lungenkarzinome konnte in einem Drittel der Proben DNA von Adenoviren der Spezies C detektiert werden (Kuwano *et al.*, 1997). Darüber hinaus gelang der Nachweis adenoviraler DNA in mehr als zwei Dritteln von Proben verschiedener pädiatrischer Hirntumore (Glioblastome, Oligodendrogliome und Ependymome), wobei in dieser Untersuchung hauptsächlich DNA der Spezies B und D sowie weniger häufig der Spezies C detektiert wurde (Kosulin *et al.*, 2007). Humane Adenoviren wurden daher erneut als potenzielle Tumoviren für den Menschen in die Diskussion gebracht.

### **2.3.1. Transformation von Nagetierzellen *in vitro***

Alle bisher untersuchten humanen Adenoviren sind in der Lage, unabhängig von ihrem tumorigenen Potenzial in Nagern, primäre Nagetierzellen *in vitro* zu transformieren (Nevins and Vogt, 2007). Dieses wird in der Regel durch die Transfektion von viraler DNA erzielt (Graham, 1984). Dabei kommt es zur Immortalisierung, einem veränderten Wachstumsverhalten sowie zu morphologischen Veränderungen der Zellen. Zusätzlich ist zu beobachten, dass die transformierten Zellen durch den Verlust der Kontaktinhibition in dichten und zum Teil mehrschichtigen Kolonien (*Foci*) wachsen. Jedoch können nicht alle auf diese Weise transformierten Zellen nach Inokulation in Nagetiere ein Tumorwachstum erzeugen. Die Tumorigenität hängt einerseits vom Virustyp, andererseits vom Immunstatus des Versuchstiers ab (Graham, 1984; Shenk, 2001; Williams *et al.*, 1995). So können Zellen, die durch HAdV12 (hoch onkogen) transformiert wurden, in immunkompetenten Ratten ein Tumorwachstum hervorrufen, während HAdV2- oder HAdV5-transformierte Zellen nicht dazu in der Lage sind (beide Virustypen gelten als nicht onkogen in Versuchstieren). Allerdings können dieselben Zellen Tumore in immunsupprimierten (thymusdefizienten) Nacktmäusen erzeugen, denen die zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) fehlen. Dies zeigt, dass das tumorigene Potenzial adenoviral transformierter Zellen hauptsächlich von den thymusabhängigen Komponenten des Immunsystems der Versuchstiere abhängig ist (Bernards *et al.*, 1982; Cook and Lewis, 1987; Cook *et al.*, 1987; Graham, 1984; Raska and Gallimore, 1982; Shenk, 2001; Williams *et al.*, 1995).

### 2.3.2. Transformation von humanen Zellen *in vitro*

Die *in vitro*-Transformation primärer humaner Zellen durch humane Adenoviren ist im Gegensatz zur Transformation von Nagerzellen bis heute nur in wenigen Fällen gelungen. Die Tatsache, dass viele Versuche fehlschlagen, lässt vermuten, dass eine abortive Infektion in nicht-permissiven Nagetierzellen die Grundlage für eine effiziente Transformation in jenen Zellen sein mag. Dass einer Transformation in Nagetierzellen weniger zelluläre Kontrollmechanismen entgegenstehen als im Falle humaner Zellen, mag ein weiterer Faktor für die unterschiedliche Transformierbarkeit beider Zelltypen sein (Akagi, 2004). Bei den humanen Zellen, die sich bislang transformierbar zeigten, handelte es sich ausschließlich um embryonale Zellen, wobei die Transformation in diesen Fällen durch Transfektion von HAdV12- oder HAdV5-DNA-Fragmenten erzielt wurde (Byrd *et al.*, 1982; Fallaux *et al.*, 1996; Gallimore *et al.*, 1986; Graham *et al.*, 1977; Schiedner *et al.*, 2000; Shaw *et al.*, 2002; van den Heuvel *et al.*, 1992; Whittaker *et al.*, 1984). Graham und Kollegen gelang es erstmalig im Jahr 1977, humane embryonale Nierenzellen (HEK = *human embryonic kidney cells*) durch die Behandlung mit gescherter HAdV5-DNA zu transformieren. Daraus resultierte die bekannte Zelllinie HEK293 (Graham *et al.*, 1977). Die gleichermaßen bekannte Zelllinie HER911 resultierte aus der Transformation von humanen embryonalen Retinoblasten (HER = *human embryonic retinoblasts*) durch HAdV5-DNA (Fallaux *et al.*, 1996). Schiedner und Kollegen gelang es schließlich nur wenige Jahre später, Amniozyten durch die Transfektion der E1-Region von HAdV5 zu transformieren. Aus diesem experimentellen Ansatz ging die Zelllinie N52.E6 hervor (Schiedner *et al.*, 2000).

### 2.3.3. Funktion adenoviraler Onkoproteine

Adenovirale Transformation ist ein vielstufiger Prozess und wird nach heutigem Kenntnisstand mit den Genprodukten der E1- und der E4-Region des Virusgenoms in Verbindung gebracht (Bernards and Van der Eb, 1984; Tauber and Dobner, 2001a; Tauber and Dobner, 2001b; Tooze, 1981). Im Falle von HAdV5 sind dies die Produkte der frühen Transkriptionseinheiten E1A und E1B sowie E4 (E4orf3 und E4orf6) (Berk, 2007; Endter and Dobner, 2004; Nevels *et al.*, 1999a; Nevels *et al.*, 1999b).

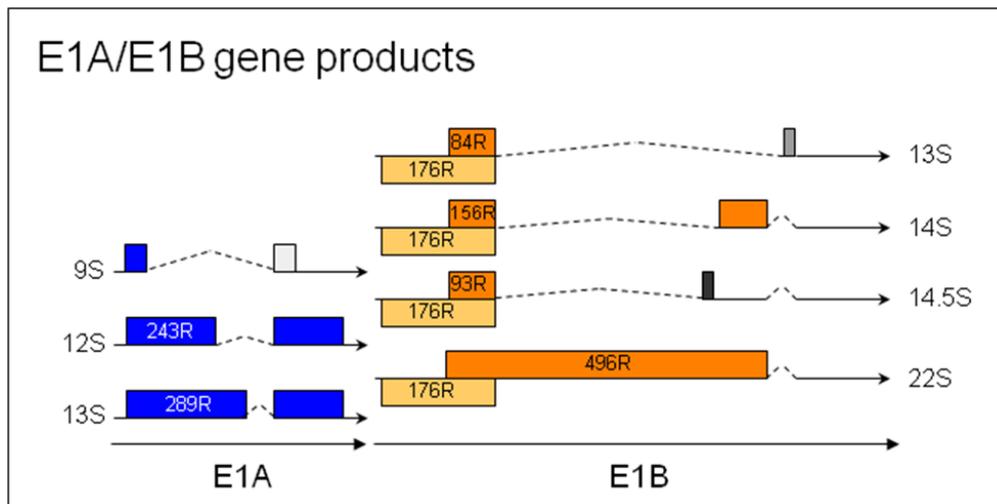
### 2.3.3.1. Genprodukte der E1-Region

Am linken Ende des adenoviralen Genoms ist die frühe Region 1 (E1) lokalisiert, die in die Transkriptionseinheiten E1A und E1B eingeteilt wird (Abbildung 5). Adenoviral induzierte Zelltransformation wird vor allem durch das Zusammenspiel ihrer Genprodukte vermittelt. Alle humanen Adenoviren besitzen eine ähnlich organisierte E1-Region und weisen ebenfalls eine annähernd gleiche Zusammensetzung von E1-Genprodukten auf (Endter and Dobner, 2004; Shenk, 2001).

Die Hauptprodukte der E1A-Transkriptionseinheit sind die beiden nukleären multifunktionellen Proteine E1A-12S und E1A-13S, die durch alternatives Spleißen von einem Vorläufertranskript generiert werden. Darüber hinaus sind drei weitere E1A-mRNA-Spezies (11S, 10S und 9S) bekannt, die im späteren Infektionsverlauf akkumuliert werden, deren Funktion jedoch bislang nicht definiert werden konnte (Berk, 2007; Endter and Dobner, 2004). Verschiedene experimentelle Ansätze haben gezeigt, dass die alleinige Expression von E1A-Proteinen ausreichend für eine Immortalisierung bzw. partielle Transformation primärer Nagerzellen ist (Endter and Dobner, 2004; Houweling *et al.*, 1980; Russell, 2000). Grundlage dessen ist die Eigenschaft von E1A-Proteinen, den Eintritt ruhender Zellen in die S-Phase zu stimulieren und somit den Zellzyklus anzutreiben (Berk, 2005; Dyson and Harlow, 1992; Endter and Dobner, 2004). Dies erfolgt durch die Bindung und Blockierung des Tumorsuppressors pRb, der als Inhibitor von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie fungiert und zentrale Funktion in der Zellzykluskontrolle besitzt. Die E2F-Transkriptionsfaktoren sind ihrerseits für die Aktivierung proliferationsrelevanter Gene verantwortlich (Nevins, 1992; Nevins *et al.*, 1997; Sidle *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 2001). Die Folge der Interaktion von E1A und pRb ist die außerplanmäßige DNA-Synthese und Zellproliferation, wodurch einerseits optimale Bedingungen für die Virusvermehrung geschaffen werden, andererseits aber auch die Immortalisierung von primären Zellen bewirkt wird (Moran *et al.*, 1986; Shenk, 2001). Im Gegensatz dazu haben die E1A-Proteine jedoch auch antiproliferative Eigenschaften, indem sie den Tumorsuppressor p53 stabilisieren, der seinerseits Apoptose und Seneszenz der Wirtszelle vermittelt (Sabbatini *et al.*, 1995; White, 1995). Ferner ist E1A in der Lage, auch p53-unabhängige Apoptosewege zu aktivieren (Marcellus *et al.*, 1996; Teodoro *et al.*, 1995). Zur vollständigen Transformation primärer Zellen sind zusätzlich zu den E1A-Proteinen auch die E1B-Genprodukte erforderlich.

Die E1B-Transkriptionseinheit grenzt an die E1A-Transkriptionseinheit und kodiert für mindestens fünf verschiedene mRNAs, die durch differenzielles Spleißen generiert werden und von denen unter anderem das E1B-55K- sowie das E1B-19K-Protein translatiert werden (Bos *et al.*, 1981; Perricaudet *et al.*, 1979). Beide Proteine können zusammen mit E1A primäre Nagetierzellen transformieren, wobei sie zwar unabhängig voneinander, jedoch additiv wirken (Bernards *et al.*, 1986; McLorie *et al.*, 1991; Rao *et al.*, 1992; White and Cipriani, 1990). Im Gegensatz zum E1B-19K-Protein wirkt das E1B-55K-Protein in der Zelltransformation als direkter Repressor des Promotors von p53 (Yew and Berk, 1992; Yew *et al.*, 1994). Das auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnete p53 wird in Folge von DNA-Schäden, aber auch durch Onkogenaktivierung und Telomerverkürzung aktiviert. Gleichzeitig wird seine Halbwertszeit verlängert. Akkumuliertes und aktiviertes p53 vermittelt die Expression von Genen, die an der Zellzykluskontrolle, der Apoptoseinduktion und der DNA-Reparatur beteiligt sind (Asker *et al.*, 1999; Cox and Lane, 1995; Giaccia and Kastan, 1998; Levine, 1997; Prives and Hall, 1999). In seiner Eigenschaft, p53 zu inaktivieren, wirkt E1B-55K somit der E1A-induzierten Stabilisierung des Tumorsuppressors entgegen, um einen vorzeitigen Zelltod zu verhindern, der die Virusvermehrung unterbinden würde. Dieses geschieht über verschiedene Mechanismen. Durch seine Bindung an die N-terminale Domäne von p53 wird zum einen die Transaktivierung p53-regulierter Gene inhibiert (Kao *et al.*, 1990; Shen *et al.*, 2001; Yew *et al.*, 1994). Zum anderen findet unter dem Einfluss von E1B-55K eine Umlokalisierung von p53 in perinukleäre Proteinaggregate (*perinuclear bodies*) statt, was den Abbau des Tumorsuppressors in den so genannten Aggresomen nach sich zieht (Blair Zajdel and Blair, 1988; Liu *et al.*, 2005; Zantema *et al.*, 1985). Ferner wird p53 in transformierten Zellen durch die Kooperation von E1B-55K und E4orf6 (2.3.3.2.) dem proteasomalen Abbau zugeführt. Dazu bilden die beiden Proteine zusammen mit den zellulären Faktoren Elongin B und C, Cullin 5 und Rbx1 einen E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex, der nicht nur für den Abbau von p53, sondern auch noch weiterer zellulärer Substrate sorgt. Eines dieser Substrate ist das Protein Mre11, das Bestandteil des Mre11-Rad50-Nbs1-Komplexes (MRN-Komplex) ist (Blanchette *et al.*, 2004; Harada *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2005; Querido *et al.*, 2001; Stracker *et al.*, 2002). Diesem Proteinkomplex kommen wichtige Funktionen in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, in der Kontrolle des Zellzyklus sowie dem Erhalt von Telomeren zu (Assenmacher and Hopfner, 2004). Auch die DNA-Ligase IV, ein weiteres bedeutendes Protein in der DNA-Reparatur, wurde als Substrat der E1B-55K-E4orf6-Ubiquitinligase identifiziert (Baker *et al.*, 2007). Werden diese Faktoren

an ihrer Funktion gehindert, kann dies den Transformationsprozess fördern (Hartl *et al.*, 2008).



**Abb. 5: Die Genprodukte der frühen Region E1**

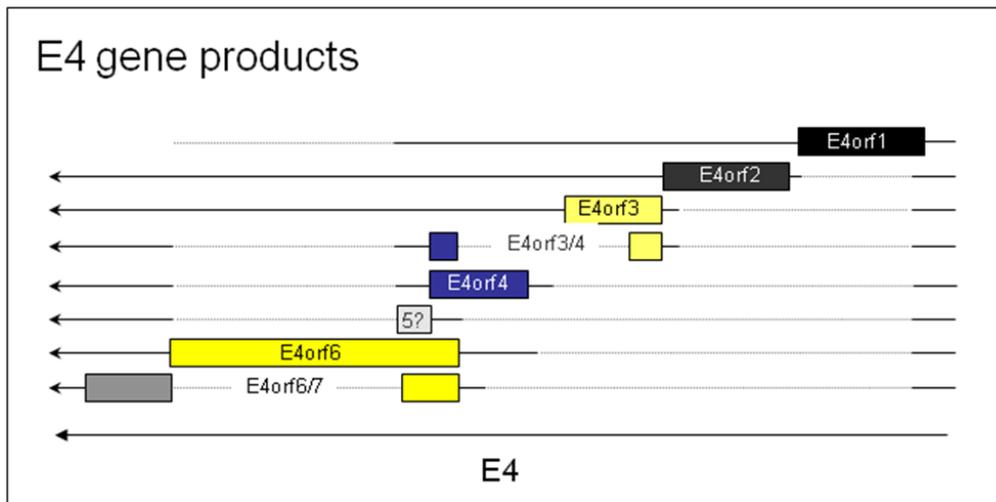
Die adenovirale E1-Region besteht aus den Transkriptionseinheiten E1A und E1B. Die Transkriptionseinheit E1A kodiert für eine 13S- sowie eine 12S-mRNA. Zudem werden drei weitere mRNA-Spezies generiert, 11S, 10S und 9S (11S und 10S sind hier nicht abgebildet). Die Transkriptionseinheit E1B kodiert neben weiteren kleinen mRNAs für die 22S-mRNA, von der die beiden Polypeptide E1B-55K und E1B-19K translatiert werden. S = Sedimentationskoeffizient; R = Aminosäurerest (Abteilung Molekulare Virologie, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg).

### 2.3.3.2. Genprodukte der E4-Region

Verschiedenen Daten der letzten Jahre zufolge ist das adenovirale Transformationspotenzial nicht nur auf die Funktionen der Genprodukte der E1-Region zurückzuführen, sondern auch denen der frühen Region 4 (E4) zuzuschreiben. Diese liegt am rechten Ende des adenoviralen Genoms, die entgegengesetzt zu den E1-, E2- und E3-Genen sowie den späten Genen von rechts nach links transkribiert wird (Abbildung 6). Im Falle von HAdV5 werden sechs verschiedene E4-Proteine kodiert, die als E4orf1, E4orf2, E4orf3, E4orf4, E4orf6 und E4orf6/7 bezeichnet werden (orf = *open reading frame*). Die von der E4-Region transkribierten mRNAs werden mittels alternativen Spleißens aus einem gemeinsamen Vorläufertranskript generiert, wobei sie außerdem von einem gemeinsamen Promotor kontrolliert werden (Modrow and Falke, 2002). Die Genprodukte der E4-Region erfüllen eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen, die von zentraler Bedeutung für eine erfolgreiche Virusvermehrung sind. Über ein komplexes Netzwerk aus Interaktionen mit zellulären Faktoren nehmen die E4-Proteine zu diesem Zweck Einfluss auf Transkription,

posttranslationale Modifikationen, Signalübertragung, DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle und Apoptose (Tauber and Dobner, 2001b).

In Bezug auf virale Transformation und Onkogenität scheinen vor allem die Proteine E4orf3 und E4orf6 eine wesentliche Rolle zu spielen. Kooperierend mit den Proteinen der E1-Region sind beide E4-Proteine in der Lage, die Transformation von Rattenzellen zu verstärken. Zellen, in denen E1A, E1B, E4orf3 und/oder E4orf6 exprimiert werden, zeigen darüber hinaus Eigenschaften, die für eine vollständige onkogene Transformation sprechen, wie die Induktion von Tumorstadium nach Injektion in Nacktmäuse (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1999a; Nevels *et al.*, 1999b). Beide E4-Proteine beeinflussen im viralen Replikationszyklus Kontrollmechanismen der Wirtszelle auf allen Ebenen der Genexpression. Dabei weisen sie zum Teil funktionelle Überlappungen auf, übernehmen jedoch auch voneinander unabhängige Funktionen in der viralen DNA-Replikation, der späten viralen Proteinsynthese, dem Abschalten der Proteinsynthese der Wirtszelle sowie der Assemblierung von Nachkommenviren (Bridge and Ketner, 1989; Bridge and Ketner, 1990; Halbert *et al.*, 1985; Huang and Hearing, 1989). Um die Bildung konkatemerer Virusgenome zu unterbinden, interagieren sowohl E4orf3 als auch E4orf6 mit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK), die eine Schlüsselfunktion in der DNA-Reparatur einnimmt (Boyer *et al.*, 1999; Nicolas *et al.*, 2000; Weiden and Ginsberg, 1994). Darüber hinaus interagieren sowohl E4orf3 als auch E1B-55K/E4orf6 mit Mre11, einer Komponente des DNA-Reparaturkomplexes MRN, wodurch einer Konkaterisierung ebenfalls entgegengewirkt wird (Araujo *et al.*, 2005; Evans and Hearing, 2005; Mohammadi *et al.*, 2004; Stracker *et al.*, 2002; Stracker *et al.*, 2005). Ferner bindet E4orf6 ähnlich wie E1B-55K an p53, und zwar sowohl an den N-Terminus als auch an den C-Terminus des Tumorsuppressors. Offenbar wirken sowohl E4orf6 als auch E1B-55K kooperativ der E1A-induzierten Stabilisierung von p53 entgegen, indem das Protein verstärkt dem proteasomalen Abbau zugeführt wird (Cathomen and Weitzman, 2000; Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1999a; Querido *et al.*, 2001; Roth *et al.*, 1998; Rubenwolf *et al.*, 1997; Steegenga *et al.*, 1998; Wienzek *et al.*, 2000). Eine weitere Funktion von E4orf3 ist die Reorganisation der so genannten PML (*promyelocytic leukemia*) *nuclear bodies* (PML NBs), die an DNA-Reparatur, Tumorsuppression sowie antiviraler Interferonantwort teilhaben (Carvalho *et al.*, 1995; Dellaire and Bazett-Jones, 2004; Puvion-Dutilleul *et al.*, 1995; Regad and Chelbi-Alix, 2001).



**Abb. 6: Die Genprodukte der frühen Region E4**

Die E4-Region von HAdV5 kodiert für die sechs Proteine E4orf1, E4orf2, E4orf3, E4orf4, E4orf6 und E4orf6/7. orf = *open reading frame* (offener Leserahmen) (Abteilung Molekulare Virologie, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg).

## 2.4. Aufgabenstellung

Untersuchungen der letzten Jahrzehnte beweisen ein onkogenes Potenzial humaner Adenoviren im Tiermodell, ein Sachverhalt, der auch im Hinblick auf virusinduzierte Tumorerkrankungen beim Menschen von großem Interesse ist. Die *in vitro*-Transformation humaner Primärzellen durch adenovirale Onkogene ist allerdings im Gegensatz zur Transformation primärer Nagerzellen bis heute nur sehr selten gelungen. Die in der Literatur beschriebenen Beispiele beziehen sich ausschließlich auf verschiedene Zellen embryonalen Ursprungs, die zu diesem Zweck überwiegend mit Teilen des Genoms von HAdV5 transfiziert worden sind.

Zur *in vitro*-Transformation primärer Zellen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst ein lentivirales Vektorsystem etabliert werden, um im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Transfektionsexperimenten stabile Integration und Expression der adenoviralen Zielgene E1A und E1B-55K sowie E4orf3 und E4orf6 (HAdV5) in den damit behandelten Zellen zu erreichen. Dieses System sollte an Nierenzellen neugeborener Ratten getestet werden.

Darüber hinaus bestand die Aufgabenstellung darin, jenes System auf humane Zellen embryonalen Ursprungs zu übertragen. In der vorliegenden Arbeit stellten dies Amniozyten dar. Da es sich bei Amniozyten um eine Mischpopulation von Zellen handelt, stellte sich

ferner die Frage, ob ein bestimmter Zelltyp präferenziell durch adenovirale Onkogene transformierbar sein könnte. Die Population enthält neben anderen Zelltypen Progenitor- und Stammzellen wie beispielsweise mesenchymale Stromazellen, auf die der Fokus gerichtet werden sollte. Nach erfolgreicher Transduktion sollten morphologisch transformierte mesenchymale Stromazellen monoklonal isoliert und charakterisiert werden. Hauptziel war hierbei, die Zellklone zum einen hinsichtlich chromosomaler Veränderungen zu analysieren. Zum anderen sollte ihr Potenzial untersucht werden, Tumorwachstum in immunsupprimierten Nacktmäusen zu induzieren.

Insgesamt sollten diese Arbeiten zu neuen Erkenntnissen im Rahmen der Transformation und Onkogenität des HAdV5 der Spezies C in humanen Primärzellen führen und damit einen weiteren Hinweis für viral bedingte Krebserkrankungen beim Menschen liefern.

### 3. MATERIAL

#### 3.1. Bakterien

BEZEICHNUNG	GENOTYP
<b>DH5<math>\alpha</math></b>	F <sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), $\lambda$ - (Hanahan, 1983)
<b>XL2-Blue</b>	endA1 gyrA96( <i>nal</i> <sup>R</sup> ) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> $\Delta$ ( <i>lacZ</i> )M15 Amy Cm <sup>R</sup> ] hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) (Stratagene)
<b>XL10-Gold</b>	endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte $\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183 $\Delta$ ( <i>mcrCB</i> - <i>hsdSMR</i> - <i>mrr</i> )173 tet <sup>R</sup> F'[proAB lacI <sup>q</sup> $\Delta$ M15 Tn10(Tet <sup>R</sup> Amy Cm <sup>R</sup> )] (Stratagene)

#### 3.2. Säugerzellen

#	BEZEICHNUNG	EIGENSCHAFTEN
59	<b>HEK293</b>	humane embryonale Nierenzellen, die die HAdV5 E1-Region stabil exprimieren (Graham <i>et al.</i> , 1977)
60	<b>HEK293T</b>	HEK293-Zellen, die das <i>large T antigen</i> des SV40 exprimieren
206	<b>ABS1</b>	etablierte Rattenzelllinie, stabil transformiert mit HAdV5 E1A (E1A-12S und E1A-13S) sowie E1B-55K und E4orf6 (Nevels <i>et al.</i> , 1999a)
447	<b>9968</b>	primäre humane Amniozyten einer anonymen Spenderin, männlicher Chromosomensatz mit Trisomie 21
694	<b>HepaRG</b>	pseudoprimäre humane Hepatom-Zelllinie (Gripon <i>et al.</i> , 2002)
711	<b>MRC-5</b>	primäre humane embryonale Lungenfibroblasten (ECACC)
	<b>A-UKE 14</b>	primäre humane Amniozyten einer anonymen Spenderin (UKE), Chromosomensatz unbekannt
	<b>BRK</b>	primäre Nierenzellen aus 3 bis 5 Tage alten CD-Ratten (Charles River)
	<b>hMSC (Lonza)</b>	primäre humane mesenchymale Stromazellen aus dem Knochenmark eines anonymen Spenders (Lonza), männlicher Chromosomensatz
	<b>hMSC (UKE)</b>	primäre humane mesenchymale Stromazellen aus dem Knochenmark eines anonymen Spenders (UKE), Chromosomensatz unbekannt
	<b>9968 AB Klon 1</b>	aus humanen Amniozyten resultierender Zellklon, der durch lentivirale Transduktion von HAdV5 E1A und E1B-55K generiert wurde
	<b>9968 AB Klon 2</b>	aus humanen Amniozyten resultierender Zellklon, der durch lentivirale Transduktion von HAdV5 E1A und E1B-55K generiert wurde
	<b>9968 AB Klon 3</b>	aus humanen Amniozyten resultierender Zellklon, der durch lentivirale Transduktion von HAdV5 E1A und E1B-55K generiert wurde

<b>hMSC AB Klon 1</b>	aus humanen mesenchymalen Stromazellen resultierender Zellklon, der durch lentivirale Transduktion von HAdV5 E1A und E1B-55K generiert wurde
<b>hMSC AB Klon 2</b>	aus humanen mesenchymalen Stromazellen resultierender Zellklon, der durch lentivirale Transduktion von HAdV5 E1A und E1B-55K generiert wurde
<b>hMSC AB Klon 8</b>	aus humanen mesenchymalen Stromazellen resultierender Zellklon, der durch lentivirale Transduktion von HAdV5 E1A und E1B-55K generiert wurde
<b>hMSC AB Klon 9</b>	aus humanen mesenchymalen Stromazellen resultierender Zellklon, der durch lentivirale Transduktion von HAdV5 E1A und E1B-55K generiert wurde
<b>hMSC AB Klon 10</b>	aus humanen mesenchymalen Stromazellen resultierender Zellklon, der durch lentivirale Transduktion von HAdV5 E1A und E1B-55K generiert wurde

### 3.3. Nukleinsäuren

#### 3.3.1. Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden als Startermoleküle für Sequenzierreaktionen und PCR-Amplifikationen verwendet. Sie wurden von der Firma Metabion hergestellt. In der ersten Spalte ist die Nummer des Oligonukleotids in der Filemaker Pro-Datenbank der Arbeitsgruppe angegeben.

#	BEZEICHNUNG	SEQUENZ	VERWENDUNG
63	<b>E4orf3rev</b>	CGCGGGATCCGTCGACTTATTCCAAAAGATTATCC	Sequenzierung
112	<b>E1B 1197-1215 FW :19</b>	GGGTAACAGGAGGGGGGTG	Sequenzierung
330	<b>E1A fw bp 626 fwd</b>	CCGAAGAAATGGCCGCCAGTCTTTTGGACCAGC	PCR
332	<b>E1A 13S bp1073 rev</b>	GCCACAGGTCCTCATATAGCAAAGCG	Sequenzierung
641	<b>E1B55K-PCR-rev</b>	GCCAAGCACCCCCGGCCACATATTTATCATGC	Sequenzierung
780	<b>Seq E1-Box fwd 1251 bp</b>	GTCCTGTGTCTGAACCTGAGC	Sequenzierung

782	<b>Seq E1-Box fwd</b>	CAAGGATAATTGCGCTAATGAGC	Sequenzierung
	<b>2454 bp</b>		
783	<b>Seq E1-Box rev</b>	CCACACTCGCAGGGTCTGC	Sequenzierung
	<b>3373 bp</b>		
897	<b>E1A_fw</b>	CGGGATCCACCATGGGACATATTATCTGCC	Sequenzierung
935	<b>E4orf3 5'</b>	GGCTGAAGGTGGAGGGCGC	Sequenzierung
1284	<b>E1AgPCRrev</b>	GGCTCAGGCTCAGGTTTCAGACACAGG	PCR
1517	<b>E1A_rev_EcoR1</b>	GCGAATTCATTATGGCCTGGGGCGTTTAC	Sequenzierung
1524	<b>E4orf6_rev_</b>	GCGAATTCACATGGGGGTAGAGTCATAATCG	PCR/
	<b>EcoR1_2</b>		Sequenzierung
1525	<b>E4orf6_fwd_</b>	CGGGATCCAACATGACTACGTCCGGC	PCR/
	<b>BamH1</b>		Sequenzierung
1567	<b>LeGOinsFwd</b>	AGCTCACAACCCCTCACTCG	Sequenzierung
1568	<b>LeGOinsRev</b>	GGGGCGGAATTTACGTAGCG	Sequenzierung
1853	<b>LeGO-SFFV-fwd</b>	CCTGCGCCTTATTTGAATTAACC	PCR
1854	<b>LeGO-E1B-rev</b>	CAGCAGATCAAGCTCATTAGCG	PCR
1856	<b>LeGO-E1A-rev</b>	AAACTCCTCACCCCTCTTCATCC	PCR

### 3.3.2. Vektoren

Folgende Vektoren wurden für Subklonierungen oder zur Kontrolltransduktion von Zellen verwendet. In der ersten Spalte ist die Nummer des Vektors in der Filemaker Pro-Datenbank der Arbeitsgruppe angegeben. Vektorkarten der LeGO-Konstrukte befinden sich im Anhang.

#	BEZEICHNUNG	VERWENDUNG	REFERENZ
222	<b>LeGO-iV2</b>	lentiviraler Expressionsvektor	(Weber <i>et al.</i> , 2008)
223	<b>LeGO-iCer2</b>	lentiviraler Expressionsvektor	(Weber <i>et al.</i> , 2008)
234	<b>LeGO-iBLB2</b>	lentiviraler Expressionsvektor	Stammsammlung der Arbeitsgruppe

### 3.3.3. Rekombinante Plasmide

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

#	BEZEICHNUNG	VEKTOR	FREMDGEN	REFERENZ
1368	<b>pAcG3X-E4orf3</b>	pAcG3X	HAdV5 E4orf3	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1390	<b>E1-Box_E1B-55K-</b>	pPG-S3	HAdV5 E1-Box (ohne E1B-55K)	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1576	<b>E1B-55Kdp9_pcDNA3</b>	pcDNA3	HAdV5 E1B-55K (ohne pIX)	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1664	<b>E4orf6 splice fix</b>	pcDNA3	HAdV5 E4orf6	Stammsammlung der Arbeitsgruppe
1968	<b>pCMV-VSV-G</b>	pCMV	G-Protein des VSV	(Beyer <i>et al.</i> , 2002)
1969	<b>pRSV-Rev</b>	pRSV	HIV-1 <i>rev</i>	(Dull <i>et al.</i> , 1998)
1970	<b>pMDLg/pRRE</b>	pMDL	HIV-1 <i>gag</i> , HIV-1 <i>pol</i>	(Dull <i>et al.</i> , 1998)
1982	<b>LeGO-iCer2-E4orf3</b>	LeGO-iCer2	HAdV5 E4orf3	diese Arbeit
1983	<b>LeGO-iCer2-E1B-55K</b>	LeGO-iCer2	HAdV5 E1B-55K	diese Arbeit
1997	<b>LeGO-iV2-E1A</b>	LeGO-iV2	HAdV5 E1A	diese Arbeit
2010	<b>LeGO-iCer2-E4orf6</b>	LeGO-iCer2	HAdV5 E4orf6	diese Arbeit
2104	<b>LeGO-iBLB2-55K</b>	LeGO-iBLB2	HAdV5 E1B-55K	diese Arbeit
2106	<b>LeGO-iBLB2-E4orf3</b>	LeGO-iBLB2	HAdV5 E4orf3	diese Arbeit
2112	<b>LeGO-iBLB2-E4orf6</b>	LeGO-iBLB2	HAdV5 E4orf6	diese Arbeit

### 3.4. Antikörper

#### 3.4.1. Primärantikörper

BEZEICHNUNG	EIGENSCHAFTEN
<b>anti-E1A (M58)</b>	monoklonaler Maus-Antikörper gegen E1A-Proteine (E1A-9S, E1A-12S und E1A-13S) von HAdV5 (Harlow <i>et al.</i> , 1985)
<b>anti-E1B-55K (2A6)</b>	monoklonaler Maus-Antikörper gegen das E1B-55K-Protein von HAdV5 (Sarnow <i>et al.</i> , 1982)
<b>anti-<math>\beta</math>-Aktin (AC-15)</b>	monoklonaler Maus-Antikörper gegen $\beta$ -Aktin (Sigma, Katalog-Nr. A5441)
<b>anti-CD14-PerCP</b>	monoklonaler PerCP-gekoppelter Maus-Antikörper gegen humanes CD14, Isotyp IgG2a (BD Pharmingen, Katalog-Nr. 345786)
<b>anti-CD34-PE</b>	monoklonaler PE-gekoppelter Maus-Antikörper gegen humanes CD34 (gp 105-120), Isotyp IgG1 (BD Pharmingen, Katalog-Nr. 555822)
<b>anti-CD45-FITC</b>	monoklonaler FITC-gekoppelter Maus-Antikörper gegen humanes CD45 ( <i>leukocyte common antigen</i> ), Isotyp IgG1 (BD Pharmingen, Katalog Nr. 555482)

<b>anti-CD73-PE</b>	monoklonaler PE-gekoppelter Maus-Antikörper gegen humanes CD73 (Ecto-5'-nucleotidase), Isotyp IgG1 (BD Pharmingen, Katalog-Nr. 550257)
<b>anti-CD90-FITC</b>	monoklonaler FITC-gekoppelter Maus-Antikörper gegen humanes CD90 (Thy-1), Isotyp IgG1 (Serotec, Katalog-Nr. MCA90F)
<b>anti-CD105-FITC</b>	monoklonaler FITC-gekoppelter Maus-Antikörper gegen humanes CD105 (Endoglin), Isotyp IgG1 (Serotec, Katalog-Nr. MCA1557F)
<b>anti-HLA-A,B,C-FITC</b>	monoklonaler FITC-gekoppelter Maus-Antikörper gegen humanen MHC I-Komplex, Isotyp IgG1 (BD Pharmingen, Katalog-Nr. 555552)
<b>anti-HLA-DR,DP,DQ-FITC</b>	monoklonaler FITC-gekoppelter Maus-Antikörper gegen humanen MHC II-Komplex, Isotyp IgG2a (BD Pharmingen, Katalog-Nr. 555558)

### 3.4.2. Sekundärantikörper

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

<b>BEZEICHNUNG</b>	<b>EIGENSCHAFTEN</b>
<b>HRP-anti-Maus-IgG</b>	HRP-gekoppelter Antikörper gegen Maus-IgG aus Ziege (Jackson)

Folgende Sekundärantikörper wurden für Immunfluoreszenzanalysen verwendet:

<b>BEZEICHNUNG</b>	<b>EIGENSCHAFTEN</b>
<b>FITC-anti-Maus-IgG</b>	FITC-gekoppelter Antikörper gegen Maus-IgG aus Esel, (Dianova)

### 3.5. Größen- und Molekulargewichtsstandards

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Molekülen bei der Agarose-Gelelektrophorese wurden die 1 kb und die 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs) verwendet. Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese diente die PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas) als Standard für die Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen.

### 3.6. Kommerzielle Systeme

<b>BEZEICHNUNG</b>	<b>HERSTELLER</b>
<b>omnipure-OLS</b>	Omni Life Science
<b>Plasmid Purification Mini, Midi und Maxi Kit</b>	Qiagen

<b>Protein Assay</b>	BioRad
<b>Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate</b>	Perbio Science
<b>TRAPeze Telomerase Detection Kit</b>	Chemicon

### **3.7. Enzyme, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien**

Falls im Text nicht anders aufgeführt, wurden alle Chemikalien von den Firmen AppliChem, Biomol, Fermentas, Fluka, Hartenstein, Invitrogen, New England Biolabs, Merck, Pall Life Sciences, Roche, Roth und Sigma Aldrich bezogen. Zellkulturmaterial wurde von den Firmen PAA, PAN und Gibco, sonstiges Verbrauchsmaterial von den Firmen Becton Dickinson Labware, BioRad, Biozym, Brand, Braun, CEA, Eppendorf, Greiner, Menzel-Gläser, Nunc, Pechiney Plastic, Sarstedt, Whatman und VWR bezogen.

### **3.8. Tiere**

Klassische Transformationsversuche (4.3.3. und 4.3.4.) wurden an Nierenzellen 3 bis 5 Tage alter CD-Ratten (Charles River) durchgeführt. Für die Tumorigenitätsversuche (4.8.) wurden NMRI-(*nu/nu*)-Nacktmäuse aus der Tierzucht des Tierstalls der Universität Regensburg (Herr Dr. Thilo Spruss) verwendet.

### **3.9. Computerprogramme und Datenbanken**

Texte, Tabellen und Abbildungen dieser Arbeit wurden mit der Microsoft Office-Software erstellt. Darüber hinaus wurde ein Teil der Abbildungen mit dem Programm Adobe Photoshop angefertigt. Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm CLC Workbench vorgenommen. Zur Auswertung der Bandenintensität in Agarosegelen wurde die Software Gene Tools des G-Box-Systems (Syngene) verwendet. Rohdaten aus durchflusszytometrischen Analysen wurden mit Hilfe der Software FlowJo in Histogramme umgewandelt. Die Software Filemaker Pro diente der Archivierung der verwendeten Zelllinien, Antikörper, Oligonukleotide, Vektoren und Plasmide. Zur Literaturrecherche wurde die MEDLINE-Datenbank (National Library of Medicine) unter der Adresse <http://www.ncbi.nlm.gov/PubMed/> benutzt. Die Literaturangaben dieser Arbeit wurden mit dem Programm EndNote eingefügt und bearbeitet.

## **4. METHODEN**

### **4.1. Bakterien**

#### **4.1.1. Kulturbedingungen und Lagerung von Bakterien (*E. coli*)**

##### 4.1.1.1. Plattenkulturen

Mit einer sterilen Impföse wurden einer Bakterienkolonie, einer Flüssigkultur oder einer Glycerinkultur Bakterien entnommen und auf einer LB-Agarplatte so ausgestrichen, dass von dieser nach Inkubation bei 30 oder 37°C (Heraeus Instruments) über Nacht Einzelkolonien isoliert werden konnten. Die Plattenkulturen sind nach Verschluss mit Parafilm mehrere Wochen bei 4°C haltbar.

##### 4.1.1.2. Flüssigkulturen

Steriles LB-Medium wurde ausgehend von einer Einzelkolonie oder einer Glycerinkultur mit Bakterien beimpft und diese Kultur bei 30 oder 37°C unter Schütteln (Innova 4000, New Brunswick Scientific) über Nacht inkubiert.

##### 4.1.1.3. Glycerinkulturen

In Flüssigkultur monoklonal vermehrte Bakterien wurden bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 4000 rpm abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0). Das dabei entstandene Sediment wurde anschließend in 0,5 ml sterilem LB-Medium resuspendiert und in einem CryoPure-Röhrchen mit 0,5 ml sterilem Glycerin versetzt. Diese Kulturen sind dauerhaft bei -80°C haltbar.

#### 4.1.1.4. Selektion

Sollten Bakterien auf die Anwesenheit bestimmter Plasmide selektioniert werden, wurden dem LB-Medium Antibiotika zugesetzt, deren Resistenzgene auf den Plasmiden kodiert waren. Hierzu wurden Ampicillin oder Kanamycin in den Konzentrationen 100 µg/ml bzw. 50 µg/ml eingesetzt. Die Antibiotika-Stammlösungen wurden steril filtriert und bei -20°C gelagert.

##### **LB-Medium:**

	10 g Bacto Tryptone
- ad 1L dest. H <sub>2</sub> O	5 g Bacto Yeast Extract
- pH 7 mit NaOH einstellen	10 g NaCl
- autoklavieren	

##### **LB-Agarplatten:**

- 15 g Bacto-Agar/L LB-Medium
- autoklavieren
- auf 50°C abkühlen und Platten gießen

## 4.2. Säugerzellen

### 4.2.1. Kulturbedingungen und Lagerung von Säugerzellen

#### 4.2.1.1. Kultivierung von etablierten Säugerzelllinien

Alle Arbeiten mit Säugerzellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dabei wurden die in dieser Arbeit verwendeten adhärent wachsenden Säugerzelllinien als Einschichtkulturen in liegenden Kulturflaschen, Petrischalen oder Kulturplatten (24, 12 oder 6 wells) kultiviert. Als Kulturmedium diente DMEM mit 5 oder 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin. Die Kulturen wurden bei 37°C in einem Inkubator mit 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre (Heraeus BBD 6220) inkubiert und das Nährmedium regelmäßig gewechselt. Abhängig von der Zelldichte wurden die Zellen alle 3 bis 5 Tage im Verhältnis 1:2 bis 1:10 subkultiviert. Dazu wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums mit PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin/EDTA-Lösung von den Kulturgefäßen abgelöst. Nach Inaktivierung der Proteaseaktivität des Trypsins durch Zugabe von 1 Volumen Kulturmedium

wurden die Zellen in einem Plastikröhrchen bei Raumtemperatur für 3 Minuten bei 2000 rpm abzentrifugiert (Heraeus Multifuge 3 S-R). Der Überstand wurde abgesaugt, und die Zellen wurden in einem kleinen Volumen Nährmedium resuspendiert. Schließlich wurden die Zellen im gewünschten Verhältnis in neue Kulturgefäße ausgesät, welche bereits vorgewärmtes Medium enthielten.

<b><u>10x PBS:</u></b>	80 g NaCl
- ad 1L dest. H <sub>2</sub> O	2 g KCl
- pH 7,4 mit HCl einstellen	26,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O
- autoklavieren	2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

#### 4.2.1.2. Gewinnung und Kultivierung primärer Nierenzellen neugeborener Ratten

Zur Gewinnung von Rattennierenzellen wurden die Nieren von 3 bis 5 Tage alten CD-Ratten unter semisterilen Bedingungen entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in einem Plastikröhrchen mit sterilem PBS bei Raumtemperatur aufbewahrt. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Nieren wurden in einer Petrischale mit PBS mit Hilfe von Pinzette und Skalpell zerkleinert und dann in ein weiteres Plastikröhrchen überführt. Je 20 Nieren wurden in 20 ml PBS mit 1 mg/ml Kollagenase/Dispase bei 37°C für 3 bis 4 Stunden unter mehrmaligem Schwenken inkubiert. Nach Zentrifugation bei 4°C für 10 Minuten bei 2000 rpm (Heraeus Multifuge 3 S-R) wurde der Überstand entfernt, und die sedimentierten Zellen wurden zweimal mit 20 ml PBS gewaschen. Zur Kultivierung wurden die Zellen von je 4 Nieren in vorgewärmtem Nährmedium (DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin) auf einer Petrischale (10 cm) ausgesät. Am Folgetag wurde das Medium ausgetauscht, und die Zellen wurden, wie unter 4.2.1.1. beschrieben, weiter kultiviert.

#### 4.2.1.3. Gewinnung und Kultivierung primärer humaner Amniozyten

Aus 10 bis 15 ml frisch entnommenen Fruchtwassers wurden vitale Zellen isoliert. Dazu wurde das Fruchtwasser in einem Plastikröhrchen bei Raumtemperatur für 3 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3 S-R) und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in einem kleinen Volumen BIO-AMF-2-Medium (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek Israel) aufgenommen und in einer 6-well-Kulturplatte mit 3 ml

Gesamtvolumen des Mediums kultiviert. Nach 7 Tagen wurde das Medium gegen Ham's F10 mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Ultrosor G ausgetauscht. Die adhärenenten Zellen wurden, wie unter 4.2.1.1. beschrieben, weiter kultiviert und bei Konfluenz auf größere Kulturgefäße umgesetzt, bis die Kultur den gewünschten Umfang erreicht hatte.

#### 4.2.1.4. Isolierung primärer humaner mesenchymaler Stromazellen aus dem Fruchtwasser

Die Isolierung mesenchymaler Stromazellen aus dem Fruchtwasser erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Tsai und Kollegen (Tsai *et al.*, 2004). Dazu wurden die in einer frischen Fruchtwasserprobe von 10 bis 15 ml enthaltenen Zellen in einem Plastikröhrchen bei Raumtemperatur für 3 Minuten bei 2000 rpm sedimentiert (Heraeus Multifuge 3 S-R) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 3 ml BIO-AMF-2-Medium (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek Israel) aufgenommen und in eine 6-*well*-Kulturplatte überführt. Während einer ersten fünftägigen Kultivierungsphase setzten sich adhärenente Zellen am Boden des Kulturgefäßes ab. Die im Überstand verbliebenen Zellen wurden abgenommen, erneut in einem Plastikröhrchen bei Raumtemperatur für 3 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3 S-R) und anschließend in 3 ml MesenchymStem-Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin in einer 6-*well*-Kulturschale für weitere 5 Tage kultiviert. Dabei setzte sich eine zweite Population adhärenenter Zellen am Schalenboden ab. Die so gewonnenen Zellen wurden, wie unter 4.2.1.1. beschrieben, weiter kultiviert und bei Konfluenz auf größere Kulturgefäße umgesetzt, bis die Kultur den gewünschten Umfang erreicht hatte.

#### 4.2.1.5. Kultivierung primärer humaner mesenchymaler Stromazellen

Aus dem Fruchtwasser isolierte sowie aus dem Knochenmark gewonnene mesenchymale Stromazellen der Firma Lonza wurden, wie unter 4.2.1.1. beschrieben, in MesenchymStem-Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert.

#### 4.2.1.6. Adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stromazellen

Mesenchymale Stromazellen besitzen das Potenzial, in Adipozyten, Chondroblasten sowie Osteoblasten zu differenzieren. Die Differenzierung der von der Firma Lonza bezogenen Zellen wurde von Frau PD Dr. Claudia Lange (Forschungsabteilung Zell- und Gentherapie in der Interdisziplinären Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation, UKE, Hamburg) wie unten beschrieben durchgeführt. Die adipogene Differenzierung erfolgte nach Pittenger und Kollegen (Pittenger *et al.*, 1999), die chondrogene Differenzierung nach einem modifizierten Protokoll von Shakibaei und De Souza (Shakibaei and De Souza, 1997) und die osteogene Differenzierung nach einer Methode von Jaiswal und Kollegen (Jaiswal *et al.*, 1997). Die Präparate wurden anschließend lichtmikroskopisch (Leica DMIL) ausgewertet.

##### 4.2.1.6.1. Adipogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stromazellen

Für die adipogene Differenzierung wurde eine konfluente Kultur mesenchymaler Stromazellen für 2 bis 3 Tage in einer 24-*well*-Kulturplatte in Anzuchtmedium (DMEM low glucose mit 1% Penicillin/Streptomycin und 10% pre-selected FCS (BioWhittaker)) mit 1  $\mu$ M Dexamethason, 0,5 mM Isobutylmethylxanthin, 100  $\mu$ M Indomethacin und 10  $\mu$ M Insulin kultiviert. Parallel dazu wurde eine Kontrollkultur unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Dabei erfolgte die Kultivierung wie unter 4.2.1.1. beschrieben. Anschließend wurde das Medium von den Kulturen entfernt und im Falle der zu induzierenden Kultur gegen insulinhaltiges Anzuchtmedium ausgetauscht. Die Kontrollkultur erhielt Anzuchtmedium ohne Insulin. Der Medienwechsel wurde über einen Zeitraum von 3 Wochen zweimal wöchentlich wiederholt, bis sich in der induzierten Kultur Fettvakuolen in den Zellen gebildet hatten. Die Kulturen wurden dann mit PBS gewaschen und für 10 Minuten in 10% Formalin fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift in 50% Ethanol erfolgte die Färbung der Zellen mit Sudan-Rot B für 15 bis 30 Minuten. Nach erneutem Waschen mit 50% Ethanol wurden die Zellen für 5 Minuten mit Mayer's Hämalaunlösung gefärbt. Die Zellen wurden dann für 1 Minute in Leitungswasser gewässert und nachfolgend dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Einbettung der Zellen erfolgte schließlich in Paraffinöl.

<b><u>Sudan-Rot B-Lösung:</u></b>	0,3 g Sudan-Rot B
- für 24 Stunden bei 60°C lösen	in 100 ml 70% Ethanol
- nach Erkalten filtrieren	

#### 4.2.1.6.2. Chondrogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stromazellen

Zur chondrogenen Differenzierung mesenchymaler Stromazellen wurden 150.000 Zellen in 1 ml Alginatlösung aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann tropfenweise in 0,1 M CaCl<sub>2</sub> in eine 6-well-Kulturplatte gegeben und anschließend bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert, wobei sie in Form kleiner Kugeln gelierte. Die Alginatkugeln wurden dreimal mit 0,15 M NaCl und zweimal mit Anzuchtmedium (4.2.1.6.1.) gewaschen. Danach wurden die in den Kugeln eingeschlossenen Zellen für 7 Tage, wie unter 4.2.1.1. beschrieben, kultiviert und das Medium während dieser Zeit zweimal ausgetauscht. Die Fixierung der Alginatkugeln erfolgte in 10% Formalin für 1 Stunde. Nach fünfminütigem Waschen der Kugeln mit 2% Essigsäure wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 24 Stunden mit Alcian-Blau-Lösung gefärbt. Danach wurden die Kugeln dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Dazu wurden sie für jeweils 10 Minuten in 30%, 50%, 70% und 90% Ethanol inkubiert. Die Dehydrierung wurde durch zehnmünütige Inkubation in Xylol abgeschlossen. Die so präparierten Kugeln konnten schließlich unter leichtem Druck auf einem Objektträger in Entellan eingebettet werden.

<b><u>Alginatlösung (2%):</u></b>	1 g Alginat
- bei 37°C lösen	in 50 ml 0,15 M NaCl
- sterilisieren	

#### **Alcian-Blau-Lösung:**

<b>Komponente A:</b>	50 mg Alcian-Blau 8 GX
- 6 ml konz. Essigsäure hinzufügen	in 50 ml 0,15 M NaCl
- pH 1,5 einstellen	

<b>Komponente B:</b>	4 g MgCl <sub>2</sub>
	in 50 ml 0,15 M NaCl

**Komponenten A und B mischen** (3 Tage inkubieren und vor Gebrauch filtrieren)

#### 4.2.1.6.3. Osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stromazellen

Um die osteogene Differenzierung mesenchymaler Stromazellen durchzuführen, wurde eine konfluente Kultur für 2 bis 3 Wochen in einer 24-*well*-Kulturplatte in Anzuchtmedium (4.2.1.6.1.) mit  $10^{-7}$  M Dexamethason, 50  $\mu$ M Ascorbinsäure und 10 mM  $\beta$ -Glyzerolphosphat inkubiert, wobei das Medium alle 3 bis 4 Tage gewechselt wurde. In dieser Zeit bildeten sich mineralische Ablagerungen in den so behandelten Zellen. Parallel dazu wurde eine Kontrollkultur in reinem Anzuchtmedium kultiviert. Dabei erfolgte die Kultivierung wie unter 4.2.1.1. beschrieben. Die Kulturen wurden dann mit PBS gewaschen und nachfolgend mit 4% Formaldehyd fixiert. Nach wiederholtem Waschen mit PBS sowie zweimaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurden die Zellen an der Luft getrocknet. Anschließend erfolgte die Färbung der Kulturen nach von Kossa. Dazu wurden die Zellen für 10 Minuten mit 6% Silbernitrat unter UV-Licht gefärbt, dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und für 5 Minuten mit Mayer's Hämalaunlösung gegengefärbt. Nach dem Wässern der Kulturen in Leitungswasser für 1 Minute und zweimaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurden die Zellen in Paraffinöl eingebettet.

#### 4.2.1.7. Lagerung von Säugerzellen

Für die dauerhafte Lagerung von Säugerzellen wurden subkonfluente Kulturen mit Trypsin/EDTA-Lösung vom Kulturgefäß abgelöst und in 1 Volumen Nährmedium aufgenommen. Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur für 3 Minuten bei 2000 rpm (Heraeus Multifuge 3 S-R) und Entfernung des Überstandes wurde das Sediment in 1 ml FCS mit 10% DMSO aufgenommen und in CryoPure-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden schrittweise eingefroren (2 Stunden bei  $-20^{\circ}\text{C}$ , 24 Stunden bei  $-80^{\circ}\text{C}$ ) und schließlich in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zur Rekultivierung wurden die tiefgefrorenen Zellen rasch im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut und nach Zentrifugation (Raumtemperatur, 3 Minuten, 2000 rpm, Heraeus Multifuge 3 S-R) und Verwerfen des Überstandes in einem mit vorgewärmtem Medium vorbereiteten Kulturgefäß ausgesät.

#### 4.2.2. Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Zellzahl in einer Suspension wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden die Zellen zuvor trypsiniert und entsprechend der Zelldichte in Medium verdünnt. Um lebende von toten Zellen zu unterscheiden, wurde ein Aliquot (50 µl) der Zellsuspension mit 1 Volumen Trypanblau-Lösung versetzt, wobei der Farbstoff nur toten Zellen eine blaue Färbung verleiht, während vitale Zellen farblos bleiben. Das Aliquot wurde nach Angaben des Herstellers in die Zählkammer überführt, und die Zellen aus 16 Kleinquadraten des kammereigenen Rasters wurden im Lichtmikroskop (Leica DMIL) ausgezählt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung ergibt sich nach Multiplikation der ermittelten Zellzahl mit dem Faktor  $10^4$  die Anzahl der Zellen pro ml Gesamtkultur.

**Trypanblau-Lösung:**                      0,5% Trypanblau  
    0,85% NaCl  
    in dest. H<sub>2</sub>O

#### 4.3. Lentivirale Vektoren

Virale Vektoren können verwendet werden, um genetische Informationen in eukaryotische Zellen einzubringen. Lentivirale Vektoren haben im Vergleich zu anderen viralen Vektoren den Vorteil, dass sie auch in ruhende Zellen oder Zellen, die sich nur langsam teilen, eindringen können, um ihr genetisches Material in das Wirtsgenom zu integrieren. Dieses resultiert in der stabilen Expression des Zielgens in den so behandelten Zellen und deren Tochterzellen.

##### 4.3.1. Herstellung und Lagerung rekombinanter lentiviraler Partikel

Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten lentiviralen Vektoren des LeGO-Systems (LeGO = *lentiviral gene ontology*) (Weber *et al.*, 2008) wurden alle für die viralen Strukturproteine kodierenden Regionen aus dem Genom entfernt (replikationsinkompetent), so dass der Vektor selbst keine viralen Proteine bilden kann. Anstelle der deletierten Sequenzen wurden die adenoviralen Onkogene E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 (HAdV5) getrennt voneinander in die Vektoren iV2 (E1A), iCer2 (E1B-55K, E4orf3, E4orf6) bzw.

iBLB2 (E1B-55K, E4orf3, E4orf6) eingesetzt. Die Herstellung der lentiviralen Partikel erfolgte mit Hilfe der Zelllinie HEK293T, die mit allen hierfür erforderlichen Plasmiden kotransfiziert wurde. Dieses waren die Expressionsplasmide LeGO-iV2, LeGO-iCer2 oder LeGO-iBLB2 (Kontrollen) bzw. LeGO-iV2-E1A, LeGO-iCer2-E1B-55K, LeGO-iCer2-E4orf3, LeGO-iCer2-E4orf6, LeGO-iBLB2-E1B-55K, LeGO-iBLB2-E4orf3 oder LeGO-iBLB2-E4orf6 sowie die Verpackungsplasmide pCMV-VSV-G, pMDLg/pRRE und pRSV-Rev. pMDLg/pRRE ist ein Plasmid, das sich von HIV-1 abgeleitet und die Gene *gag* (kodiert für die Nukleokapsidbestandteile p7, p17 und p24) und *pol* (kodiert für reverse Transkriptase, Integrase und Protease) enthält und somit die Verpackung der lentiviralen Partikel gewährleistet (Beyer *et al.*, 2002). pCMV-VSV-G ist ein Plasmid, das sich von VSV (*Vesicular stomatitis virus*) ableitet und für das Glykoprotein der VSV-Hülle kodiert (Beyer *et al.*, 2002). Dieses so genannte G-Protein ermöglicht eine spezies- und gewebsübergreifende Infektion von Zellen. 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 Petrischalen (15 cm) in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Vor der Transfektion wurde 1 ml Opti-MEM in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. Anschließend wurden 7,5 µg des entsprechenden LeGO-Vektors, 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) hinzugefügt. PEI ist ein polykationisches Polymer, das negativ geladene DNA aus dem Medium in Säugerzellen transportieren kann. Dabei entsteht ein Komplex mit positiv geladener Oberfläche, der an die negativ geladene Zelloberfläche bindet und schließlich durch Endozytose ins Zellinnere gelangt. Die Komponenten wurden gründlich durchgemischt, das Gemisch kurz abzentrifugiert und im Anschluss für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Kulturmedium von den zu transfizierenden Zellen abgezogen und durch 12,5 ml vorgewärmtes Opti-MEM ersetzt. Anschließend wurde das Transfektionsgemisch hinzugegeben. Nach 6 bis 8 Stunden Inkubation wurde das Medium gegen Vollmedium mit 20 mM HEPES (ausgehend von einer 1 M Stammlösung, pH 7,9) ersetzt. 48 Stunden nach der Transfektion konnten die Viruspartikel, die von den Zellen ins Medium abgegeben worden waren, geerntet werden. Dazu wurde das Medium mit einer Spritze aufgezogen, steril filtriert (Porendurchmesser 0,45 µm) und in CryoPure-Röhrchen aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt.

### 4.3.2. Bestimmung des lentiviralen Titers

Zur Bestimmung des Titers der infektiösen Lentiviruspartikel im geernteten Überstand (4.3.1.) wurden zunächst HEK293T-Zellen auf einer 24-*well*-Kulturplatte in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin ausgesät (je 50.000 Zellen pro Vertiefung). Nachdem sich die Zellen etwa 5 bis 6 Stunden später abgesetzt hatten, wurde das Medium abgezogen und gegen 500  $\mu$ l Kulturmedium mit 8  $\mu$ g/ml Polybren ersetzt. Für jede zu testende Suspension wurden die Zellen in je 2 Vertiefungen mit 10  $\mu$ l Virussuspension und in je 2 Vertiefungen mit 100  $\mu$ l Virussuspension behandelt. Eine unbehandelte Vertiefung diente als Kontrolle. Am Folgetag wurde das Medium gegen Vollmedium ausgetauscht. 72 Stunden nach der Infektion wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit je 500  $\mu$ l Trypsin/EDTA aus den Vertiefungen gelöst. Anschließend wurden die Zellen in je 1 ml Kulturmedium aufgenommen und in Plastikröhrchen überführt, in denen sie bei Raumtemperatur für 3 Minuten bei 2000 rpm abzentrifugiert wurden (Heraeus Multifuge 3 S-R). Das Sediment wurde in 200  $\mu$ l PBS resuspendiert und in Rundbodenröhrchen mit Filterdeckel überführt, wobei die Suspension durch den Filter gepresst wurde. Bis zur Analyse im Durchflusszytometer (BD FACS Canto II) wurden die Zellen auf Eis gelagert. Zellen, die Virus-DNA in ihr Genom integriert hatten, emittierten ein gelbes (im Falle von LeGO-iV2; V = *Venus*) oder blaues (im Falle von LeGO-iCer2; Cer = *Cerulean*, sowie im Falle von LeGO-iBLB2; B = BFP = *blue fluorescent protein*) Fluoreszenzsignal. Mit Hilfe des Anteils fluoreszierender Zellen in den Proben konnte der Virustiter nach folgender Formel bestimmt werden:

$$T = N \times P / V$$

T: Titer

N: Zellzahl (50.000)

V: Volumen der Virussuspension (10 bzw. 100  $\mu$ l)

P: Anteil infizierter Zellen

### 4.3.3. Infektion von Säugierzellen mit lentiviralen Partikeln

Zur Infektion von Säugierzellen mit lentiviralen Partikeln (4.3.1.) wurden die Zellen in geeignetem Nährmedium bis zu einer Konfluenz von 50 bis 70% auf einer 6-*well*-Kulturplatte kultiviert. Unmittelbar vor der Infektion wurde das Medium gegen 2 ml Kulturmedium mit 8



## 4.4. DNA-Techniken

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

Zur Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde ein modifiziertes Verfahren der alkalischen Lyse eingesetzt (Beck *et al.*, 1993). Dazu wurde eine Übernachtskultur mit einem Volumen von 1,5 ml bei Raumtemperatur für 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R), der Überstand abgesaugt und die Zellen in 300 µl Lösung A resuspendiert. Die Suspension wurde dann mit 300 µl Lösung B versetzt, vorsichtig geschwenkt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 300 µl Lösung C hinzugegeben, und das Gemisch wurde erneut für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 13.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5417R) wurde der DNA-haltige Überstand in ein Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt und die DNA für 30 Minuten bei 13.000 rpm gefällt (Eppendorf Centrifuge 5417R). Der Überstand wurde abgesaugt und das DNA-Präzipitat mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen. Nachfolgend wurde die DNA getrocknet und in 50 µl 10 mM Tris/HCl (pH 8) aufgenommen. Die so isolierte DNA konnte für Restriktions- und Sequenzanalysen (4.4.7.1. und 4.4.8.) eingesetzt werden.

Die Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA aus 100 bis 500 ml Übernachtskultur erfolgte mit Hilfe von Anionentauschersäulen des Plasmid Purification Midi und Maxi Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

**Lösung A:** 50 mM Tris/HCl  
 - Lagerung bei 4°C 10 mM EDTA  
 100 µg/ml RNase A  
 in dest. H<sub>2</sub>O

**Lösung B:** 200 mM NaOH  
 1% SDS  
 in dest. H<sub>2</sub>O

**Lösung C:** 7,5 M NH<sub>4</sub>OAc  
 - Lagerung bei 4°C in dest. H<sub>2</sub>O

#### 4.4.2. Präparation von genomischer DNA aus Säugerzellen

Zur Präparation genomischer DNA aus Säugerzellen wurden diese zunächst auf 6-well-Kulturplatten in geeignetem Kulturmedium bis zur Konfluenz kultiviert. Nach Entfernung des Mediums und Waschen mit PBS wurden die Zellen trypsinisiert, in Kulturmedium aufgenommen und in einem Plastikröhrchen bei Raumtemperatur für 3 Minuten bei 2000 rpm (Heraeus Multifuge 3 S-R) zentrifugiert. Das Zellsediment wurde zweimal mit PBS gewaschen und konnte anschließend sofort verwendet oder bei -80°C gelagert werden. Zum Aufschluss der Zellen wurden diese in 200 µl Extraktionspuffer resuspendiert und nachfolgend bei 56°C für 1 Stunde unter Schütteln (Eppendorf Thermomixer comfort) inkubiert. Danach wurde dem Lysat 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol beigefügt und die Flüssigkeit in ein Phase Lock Gel-Röhrchen (2 ml) überführt. Durch fünfminütiges Schwenken erfolgte die Homogenisierung der organischen und wässrigen Phase. Zur Phasentrennung wurde das Gemisch bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R). Das Hinzufügen von organischem Lösungsmittel sowie Homogenisierung und Zentrifugation wurden jeweils zweimal wiederholt. Anschließend wurde die DNA in der wässrigen Phase durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol und 0,07 Volumen 3 M Natriumazetat (pH 5,2) und Zentrifugation bei Raumtemperatur für 15 Minuten und 13.000 rpm ausgefällt (Eppendorf Centrifuge 5417R). Das DNA-Präzipitat wurde mit 75% Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in 20 bis 50 µl 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 (immer frisch zusetzen)
- 0,1 mg/ml RNase A (immer frisch zusetzen)
- in dest. H<sub>2</sub>O

#### 4.4.3. Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA

Die Konzentration von gelöster DNA wurde mit Hilfe des Nanodrop1000-Spektrophotometers (Peqlab) nach den Vorgaben des Herstellers bestimmt. 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.

#### 4.4.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen beruht auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit von 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 die entsprechende Menge Agarose in TBE-Puffer durch Aufkochen (Mikrowelle) gelöst, anschließend auf ca. 50°C abgekühlt und zur späteren Färbung der DNA mit 0,5 bis 1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Das noch flüssige Gel wurde dann in eine Flachbettgelapparatur (Peqlab) gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen 10x Probenpuffer versetzt und anschließend zusammen mit einem Größenstandard (1 kb DNA Ladder oder 100 bp DNA Ladder, New England Biolabs) auf das verfestigte Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 5 bis 10 V pro cm Gellänge durchgeführt. Anschließend konnten analytische Gele mit Hilfe eines Geldokumentationssystems (G-Box UV-Transilluminator und Gene Tools Software, Syngene) bei einer Wellenlänge von 312 nm ausgewertet werden. DNA-Banden präparativer Gele wurden auf einem UV-Durchlichtschirm (Syngene) bei 365 nm visualisiert und mit einem Skalpell ausgeschnitten.

##### **10x TBE:**

- ad 1 L dest. H<sub>2</sub>O

108 g Tris

55 g Borsäure

40 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8

##### **10x Probenpuffer:**

250 mg Bromphenolblau

250 mg Xylencyanol

33 ml 150 mM Tris, pH 7,6

60 ml Glyzerin

7 ml dest. H<sub>2</sub>O

#### 4.4.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (4.4.4.) für weiterführende Arbeiten wurde mit Hilfe des Kits omnipure-OLS (Omni Life Science) nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Zuvor mussten diese sorgfältig aus dem Gel ausgeschnitten werden. Nach der Isolierung wurde die in Lösung vorliegende DNA, wie unter 4.4.2. beschrieben, gefällt und gewaschen und in 20 bis 50 µl 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) aufgenommen.

Schließlich wurde die Konzentration und Qualität der DNA-Lösung über Agarose-Gelelektrophorese (4.4.4.) überprüft.

#### 4.4.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1988) ist ein Verfahren zur exponentiellen Vermehrung (Amplifikation) definierter Nukleinsäuresequenzen *in vitro*. Hierbei wird die Spezifität der Reaktion durch die Wahl der zugesetzten Starter-Oligonukleotide (*primer*) sichergestellt.

Für einen Standard-Reaktionsansatz wurden ca. 100 ng DNA sowie je 100 pmol der entsprechenden Oligonukleotide, 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 5 µl 10x PCR-Puffer und 1 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl) eingesetzt. Die Komponenten wurden in Reaktionsgefäßen (0,2 ml) auf Eis zusammengegeben und mit destilliertem Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Anschließend wurde der Ansatz in einem Thermocycler (MJ Mini Personal Cycler, BioRad) wie folgt inkubiert:

1 min bei	95°C (Denaturierung der DNA)
1 min bei	55 bis 70°C (Hybridisierung der Oligonukleotide an die Zielsequenz)
1 min pro kb bei	72°C (Polymerisation)

Dieser Zyklus wurde 30mal wiederholt. Danach folgte eine zehnminütige Inkubation des Ansatzes bei 72°C, um 3'-Enden nicht vollendeter PCR-Produkte zu komplettieren. Erfolgte die PCR zu analytischen Zwecken, wurden 5 µl der amplifizierten DNA in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (4.4.4.) und unter UV-Licht hinsichtlich Fragmentgröße überprüft. Für weiterführende Analysen wurde das Produkt sequenziert (4.4.8.) oder durch Restriktionsenzyme gespalten (4.4.7.1.).

## 4.4.7. Klonierung von DNA-Fragmenten

### 4.4.7.1. Restriktionsspaltung

Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs bezogen und zusammen mit den dazugehörigen 10x Puffern nach den Vorgaben des Herstellers eingesetzt. Für analytische Zwecke wurde 1 µg DNA mit 3 U Restriktionsendonuklease in einem Reaktionsvolumen von 20 µl für mindestens 1 Stunde gespalten (U = *unit*; Menge Enzym, die in 1 Stunde 1 µg Substrat umsetzt). Für präparative Zwecke wurden 5 bis 10 µg DNA mit 10 U Restriktionsendonuklease in einem Reaktionsvolumen von 50 µl für mindestens 3 Stunden inkubiert. Bei Verwendung mehrerer Restriktionsendonukleasen im gleichen Ansatz wurde ein Puffer gewählt, in dem alle Enzyme über eine ausreichende Aktivität verfügten. Enzyme, die aufgrund ihrer Pufferbedingungen oder Reaktionstemperatur nicht gleichzeitig verwendet werden konnten, wurden nacheinander eingesetzt. Hierbei wurde die DNA zwischen den einzelnen Reaktionsschritten gefällt, wie unter 4.4.2. beschrieben. Nach Spaltung der DNA wurden die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt (4.4.4) und gegebenenfalls aus dem Gel gereinigt (4.4.5.).

### 4.4.7.2. Ligation

Durch Restriktionsendonukleasen gespaltene DNA-Fragmente (4.4.7.1.) mit kompatiblen Enden wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase miteinander verknüpft. Linearisierte Vektor-DNA wurde, um eine Religation des Vektors zu unterbinden, mit 1 U alkalischer Phosphatase für 30 Minuten bei 37°C dephosphoryliert (Eppendorf Thermomixer comfort). DNA-Fragmente mussten vor der Ligation, wie unter 4.4.5 beschrieben, aufgereinigt werden. Zusätzlich war die Abschätzung der Konzentrationen von Vektor und Fragment erforderlich. Ein Standard-Ligationsansatz (20 µl) enthielt 20 bis 100 ng Vektor-DNA, die drei- bis zehnfache Menge des DNA-Fragmentes, das in diesen eingefügt werden sollte, sowie 2 µl 10x Ligationspuffer und 2,5 U T4-DNA-Ligase. Der Ansatz wurde über Nacht bei 13°C inkubiert (Eppendorf Thermomixer comfort) und das rekombinante Plasmid anschließend direkt zur Transformation von *E. coli* (4.4.7.3.) eingesetzt.

#### 4.4.7.3. Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Die Herstellung elektrokompetenter *E. coli* erfolgte nach einer Methode von Sharma und Schimke (Sharma and Schimke, 1996). 1 L YENB-Medium wurde mit 10 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,9 bei 37°C geschüttelt (Innova 4000, New Brunswick Scientific). Die Zellen wurden für 5 Minuten auf Eis gekühlt und dann bei 4°C für 10 Minuten bei 6000 rpm (Beckman Coulter Avanti J-E Centrifuge) abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde anschließend zweimal mit 100 ml eiskühlem destilliertem Wasser sowie einmal mit 20 ml 10% Glycerin gewaschen. Danach wurden die Zellen in 3 ml 10% Glycerin aufgenommen, in Aliquots von je 50 µl aufgeteilt, in Plastikröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Schließlich wurden die Aliquots bei -80°C gelagert.

Vor der Elektroporation wurden die elektrokompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut, 50 µl der Bakteriensuspension mit 1 bis 10 µg Plasmid-DNA vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 1 mm (BioRad) überführt. Die Elektroporation wurde mit dem Micro Pulser (BioRad) nach Vorgaben des Herstellers bei einer Spannung von 1,25 kV, einer Kapazität von 25 µF sowie einem Parallelwiderstand von 200 Ω durchgeführt. Dabei wurde eine Zeitkonstante von etwa 5 ms erreicht. Nach dem Puls wurden die Bakterien sofort mit 1 ml LB-Medium aus der Küvette gespült, in ein Plastikröhrchen überführt und bei 37°C für 1 Stunde geschüttelt (Innova 4000, New Brunswick Scientific). Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (Raumtemperatur, 10 Minuten, 4000 rpm, Eppendorf Centrifuge 5417R), in etwa 50 µl Überstand resuspendiert, auf einer LB-Agarplatte mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und bei 30 oder 37°C über Nacht inkubiert (Heraeus Instruments).

<b><u>YENB:</u></b>	7,5 g Bacto Yeast Extract
- ad 1 L dest. H <sub>2</sub> O	8 g Bacto Nutrient Broth
- autoklavieren	

#### 4.4.7.4. Identifizierung rekombinanter Klone

Mit einer sterilen Pipettenspitze wurden Einzelkolonien der transformierten *E. coli* (4.4.7.3.), die auf LB-Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum gewachsen waren, in LB-Flüssigmedium überimpft und bei 37°C über Nacht unter Schütteln inkubiert (Innova 4000,

New Brunswick Scientific). Anschließend konnte die DNA aus der Flüssigkultur, wie unter 4.4.1. beschrieben, isoliert und in Puffer aufgenommen werden. Je 5 µl davon wurden durch Restriktionsspaltung (4.4.7.1.) und nachfolgende Agarose-Gelelektrophorese (4.4.4.) analysiert. Die so identifizierten rekombinanten Klone wurden durch DNA-Sequenzierung (4.4.8.) überprüft und schließlich als Glyzerinkultur aufbewahrt (4.1.1.3.).

#### **4.4.8. DNA-Sequenzierung**

Für die Sequenzierung von Plasmiden bis zu einer Größe von 8 kb wurden 500 ng Plasmid-DNA und 6 pmol des entsprechenden Oligonukleotids mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 8 µl aufgefüllt. Die DNA-Sequenzierungen der vorliegenden Arbeit wurden von der Firma Geneart in Regensburg durchgeführt.

### **4.5. Protein-Techniken**

#### **4.5.1. Gesamtzellextrakt aus Säugerzellen**

Zur Gewinnung ausreichender Mengen Protein wurden Zellen bis zur Konfluenz in einer Petrischale (10 cm) herangezüchtet und nach Absaugen des Kulturmediums sowie Waschen mit PBS mit einem sterilen Plastikschaber vom Schalenboden abgelöst. Die Zellen wurden dann in ein Plastikröhrchen überführt und bei Raumtemperatur für 3 Minuten bei 2000 rpm abzentrifugiert (Heraeus Multifuge 3 S-R). Das Sediment wurde mit PBS gewaschen und die Zellen erneut durch Zentrifugation vom Überstand abgetrennt. Das Zellsediment wurde in einer entsprechenden Menge gekühltem Lysepuffer (RIPA *light*) resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis gestellt. Zur Gewährleistung eines vollständigen Zellaufschlusses sowie zur Fragmentierung genomischer DNA wurde das Zelllysate zweimal für 30 Sekunden mit Ultraschall (*output* 0,45 bis 0,6 Impulse/Sekunde, Branson Sonifier 450) behandelt. Größere Zellfragmente wurden durch Zentrifugation bei 4°C für 3 Minuten bei 11.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5417R) abgetrennt. Der Überstand wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für weitere Analysen verwendet.

**RIPA light:**

50 mM Tris/HCl, pH 8,0  
 150 mM NaCl  
 5 mM EDTA  
 1% Nonidet P-40  
 0,1% SDS  
 0,1% Triton X-100  
 1 mM DTT (immer frisch zusetzen)  
 1 mM PMSF (immer frisch zusetzen)  
 1 U/ml Aprotinin (immer frisch zusetzen)  
 1 µg/ml Leupeptin (immer frisch zusetzen)  
 1 µg/ml Pepstatin A (immer frisch zusetzen)  
 in dest. H<sub>2</sub>O

**4.5.2. Bestimmung der Konzentration von Proteinen**

Die Konzentration in Puffer gelöster Proteine wurde mit Hilfe des Protein Assay (BioRad) nach dem Bradford-Verfahren ermittelt (Bradford, 1976). Hierbei wird die Absorptionszunahme bei 595 nm photometrisch gemessen, nachdem die vorliegenden Proteine an das chromogene Substrat dieses Testsystems gebunden haben. Die Proteinkonzentration einer Probe lässt sich durch den Vergleich der gemessenen OD<sub>595</sub> mit den Werten einer Eichkurve ermitteln. Verschiedene Verdünnungen der zu bestimmenden Proteinprobe und 1 bis 10 µg des für die Erstellung der Eichkurve eingesetzten Rinderserumalbumins wurden in Plastikkuvetten mit PBS jeweils auf ein Gesamtvolumen von 800 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 200 µl Bradford-Reagenz wurden die Ansätze für 5 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption bei 595 nm wurde schließlich gegen einen Nullwert (800 µl PBS + 200 µl Bradford-Reagenz) photometrisch (SmartSpec Plus Spectrophotometer, BioRad) bestimmt.

**4.5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht die Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in einem diskontinuierlichen Elektrophoresesystem (Laemmli, 1970). Dabei lagert sich das negativ geladene SDS an die Proteine an, denaturiert sie und verleiht ihnen negative Ladung, so dass sie nahezu denselben Quotienten aus Ladungen pro Proteinmasse aufweisen. Die Migrationsgeschwindigkeit im Gel wird daher allein durch ihre

Masse bestimmt. Das diskontinuierliche Puffersystem sorgt dabei für eine Fokussierung der Proteine am Übergang zwischen einem niederprozentigen Sammelgel, von wo aus sie gemeinsam in ein höherprozentiges Trenngel einlaufen.

Der Aufbau der Gelapparaturen (Biometra) und das Gießen der Gele erfolgten nach den Vorgaben des Herstellers. Die genaue Zusammensetzung der Gele ist unten aufgeführt. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 1/2 Volumen 2x Lämmli-Puffer versetzt. E1B-haltige Proben wurden anschließend für 12 Minuten bei 55°C denaturiert (Eppendorf Thermomixer comfort), alle anderen Proben für 3 Minuten bei 95°C (Eppendorf Thermomixer comfort) inkubiert. Als Standard diente die PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas). Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel in TGS-Puffer durchgeführt, bis die Bromphenolblaubande das Ende des Gels erreicht hatte. Anschließend konnten die aufgetrennten Proteine im *Western Blot*-Verfahren detektiert werden (4.5.4.).

**Sammelgel (5%):**

- immer frisch ansetzen

17% Bis-/Acrylamid (30%)  
120 mM Tris/HCl, pH 6,8  
0,1% SDS  
0,1% APS  
0,1% TEMED  
in dest. H<sub>2</sub>O

**Trenngel (12%):**

- immer frisch ansetzen

41% Bis-/Acrylamid (30%)  
250 mM Tris/HCl, pH 8,8  
0,1% SDS  
0,1% APS  
0,04% TEMED  
in dest. H<sub>2</sub>O

**TGS:**

25 mM Tris  
200 mM Glyzin  
0,1% SDS  
in dest. H<sub>2</sub>O

<b>2x Lämmli:</b>	100 mM Tris/HCl, pH 6,8
- vor Gebrauch	4% SDS
14,3 µl/ml 14 M β-Mercaptoethanol	20% Glyzerin
zusetzen	0,2% Bromphenolblau
	200 mM DTT
	in dest. H <sub>2</sub> O

#### 4.5.4. Western Blot

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden diese nach der elektrophoretischen Auftrennung (4.4.4.) mittels *Western Blot*-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte in einer Tankblotapparatur (Trans-Blot Cell, BioRad) nach den Vorgaben des Herstellers in Towbin-Puffer bei einer Stromstärke von 400 mA für 90 Minuten. Danach konnten die auf der Membran immobilisierten Proteine mit Ponceau-S-Färbelösung reversibel angefärbt werden. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran in PBS-Tween mit 5% Milchpulver bei 4°C über Nacht unter Schütteln inkubiert und nachfolgend dreimal 5 Minuten in PBS-Tween gewaschen. Anschließend wurde der für das gesuchte Protein spezifische Primärantikörper in PBS-Tween verdünnt und die Membran bei Raumtemperatur für 1 bis 2 Stunden in diesem Gemisch geschwenkt. Nach Bindung des ersten Antikörpers erfolgte dreimaliges Waschen der Membran in PBS-Tween für 5 Minuten. Danach wurde der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper 1:10000 in PBS-Tween mit 3% Milchpulver verdünnt und die Membran erneut für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur in diesem Gemisch geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen in PBS-Tween erfolgte die Detektion der Proteinbanden über eine Reaktion der Peroxidase mit dem Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Perbio Science), bei der Chemilumineszenz entsteht. Dafür wurden die beiden Detektionslösungen 1:1 gemischt und auf Höhe der erwarteten Banden auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Diese wurde zwischen zwei transparente Plastikfolien in eine Filmkassette gelegt, so dass anschließend in einer Dunkelkammer ein Röntgenfilm aufgelegt werden konnte. Der Film wurde der Leuchtreaktion für 1 Sekunde bis 1 Stunde je nach Stärke der Reaktion ausgesetzt. Die Schwärzung des Röntgenfilms wurde schließlich durch maschinelle Entwicklung (Classic E.O.S., AGFA) sichtbar gemacht.

<b><u>PBS-Tween:</u></b>	0,1% Tween 20 in PBS
<b><u>Towbin-Puffer:</u></b>	25 mM Tris/HCl, pH 8,3 200 mM Glyzin 0,05% SDS 20% Methanol in dest. H <sub>2</sub> O
<b><u>Ponceau-S-Färbelösung:</u></b>	2% Ponceau S 30% Trichloressigsäure 30% Sulfosalicylsäure in dest. H <sub>2</sub> O

#### **4.5.5. Immunfluoreszenzmarkierung**

Zur Bestimmung der Lokalisation von Proteinen in intakten Zellen wurden die zu untersuchenden Zellen in 6-well-Zellkulturplatten auf sterilen Deckgläsern bis zur Subkonfluenz kultiviert. Vor der Fixierung der Zellen mit Methanol wurde zunächst das Medium entfernt, so dass die Zellen mit PBS gewaschen werden konnten. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml vorgekühltem Methanol überschichtet und für 15 Minuten bei -20°C inkubiert. Nach Lufttrocknung der Deckgläser konnten diese sofort für die Immunfluoreszenzmarkierung verwendet oder für mehrere Wochen bei -20° gelagert werden. Vor der Behandlung der auf den Deckgläsern haftenden Zellen mit Antikörpern wurden die Zellmembranen durch 15-minütige Inkubation in PBS mit 0,5% Triton X-100 permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 Stunde mit TBS-BG inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Deckgläser mit PBS wurden 50 µl einer geeigneten Verdünnung des Primärantikörpers in PBS auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Deckgläser erneut dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper, der an einen Fluoreszenzmarker gekoppelt ist, wurde 1:100 in PBS verdünnt. Darüber hinaus wurden dem Gemisch zur Anfärbung des Chromatins 0,5 µg/ml DAPI beigefügt. 50 µl dieses Gemisches wurden auf die Deckgläser gegeben und diese erneut für 1 Stunde in einer feuchten, dunklen Kammer inkubiert. Reste nicht gebundenen Antikörpers wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS-Tween entfernt. Sämtliche Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Deckgläser wurden schließlich nach kurzem Eintauchen

in destilliertes Wasser mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf einen Objektträger gelegt und mittels Glow Mounting Medium eingebettet. Die so angefertigten Präparate konnten nach wenigen Stunden fluoreszenzmikroskopisch (Leica DMI 6000 B) ausgewertet werden und waren lichtgeschützt bei 4°C für mehrere Wochen haltbar.

**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% NaN<sub>3</sub>  
 5 g/L Glyzin  
 5 g/L BSA  
 in dest. H<sub>2</sub>O

**Glow Mounting Medium:**

- bei -20°C lagern

12 g Glyzerin  
 12 ml dest. H<sub>2</sub>O  
 4,8 g Polyvinylalkohol  
 (Komponenten bei RT über Nacht mischen)  
 24 ml 0,2 M Tris/HCl (pH 8 bis 8,5)  
 (Komponenten bei 50°C für 30 min inkubieren)  
 1,15 g DABCO  
 (2x bei RT für 10 min bei 3000 rpm zentrifugieren)

**4.5.6. Immunologischer Nachweis extrazellulärer Marker an vitalen Zellen**

Zum Nachweis extrazellulärer Marker an vitalen Zellen wurden fluorochromgekoppelte Antikörper verwendet, deren Fluoreszenzsignale mittels Durchflusszytometrie detektierbar sind. Zunächst mussten die betreffenden Zellen in Nährmedium herangezogen werden (4.2.1.1.), bis die Kultur den gewünschten Umfang erreicht hatte. Für jeden zu untersuchenden Marker wurden etwa 500.000 Zellen benötigt. Nach Entfernung des Mediums und Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Alfazym vom Kulturgefäß abgelöst und anschließend in PBS resuspendiert. Nach Überführen in ein Plastikröhrchen wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 3 Minuten bei 2000 rpm abzentrifugiert (Heraeus Multifuge 3 S-R). Inzwischen wurden 3 µl des konjugierten Antikörpers in einem Reaktionsgefäß (1,5 ml) vorgelegt. Das Sediment wurde in 100 µl PBS mit 1% FCS und 1 mM EDTA (FACS-Puffer) aufgenommen und im vorbereiteten Gefäß mit dem Antikörper durchmischt. Nach Inkubation

bei 4°C für 30 bis 60 Minuten unter Lichtabschluss wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und abzentrifugiert. Schließlich wurden die so behandelten Zellen in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen, in Rundbodenröhrchen mit Filterdeckel überführt und dann im Vergleich zu ungefärbten Zellen oder mit einem Isotyp behandelten Zellen durchflusszytometrisch (BD FACS Canto II) untersucht.

#### **4.6. *Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP)***

Zum Nachweis der Telomeraseaktivität in Zellen wurde das TRAPeze Telomerase Detection Kit (Chemicon) verwendet, das auf einer von Kim und Kollegen entwickelten Methode basiert (Kim *et al.*, 1994). Es handelt sich um ein System, bei dem die zelluläre Telomerase in einem Zelllysat zunächst telomere Wiederholungen (GGTTAG) an das 3'-Ende eines Substrat-Oligonukleotids anfügt. Im zweiten Schritt werden die verlängerten Produkte mittels PCR amplifiziert, wobei ein charakteristisches Bandenmuster entsteht, das aus einer Reihe von Fragmenten besteht, die sich, beginnend bei 50 nt, in ihrer Größe um je 6 nt unterscheiden (50, 56, 62, 68 nt usw.). Diese Produkte werden dann elektrophoretisch in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die DNA-Banden werden schließlich nach Behandlung mit Ethidiumbromid mittels UV-Licht visualisiert. Alle Arbeitsschritte erfolgten nach den Vorgaben des Herstellers.

#### **4.7. Zytogenetische Analyse humaner Zellen**

Zytogenetische Untersuchungen an primären humanen mesenchymalen Stromazellen wurden bei der Firma MVZ genteQ in Hamburg (Herr Prof. Dr. Karsten Held) in Auftrag gegeben. Zytogenetische Analysen an transformierten Klonen humaner mesenchymaler Stromazellen wurden von der Firma labdia Labordiagnostik in Wien (Frau DI Dr. Elisabeth Krömer-Holzinger) durchgeführt.

#### **4.8. Tumorigenitätstest transformierter Zellklone in Nacktmäusen**

Onkogen transformierte Zellen können bei Injektion in immundefiziente Mäuse ein Tumorwachstum hervorrufen. Die hinsichtlich ihres onkogenen Potenzials zu untersuchenden

Zellen wurden durch Abschaben mit einem Plastischaber von den Kulturgefäßen abgelöst, zweimal mit PBS gewaschen und in serumfreiem DMEM resuspendiert, so dass die Suspension eine Konzentration von  $10^7$  Zellen besaß. NMRI-(*nu/nu*)-Nacktmäusen mit einem mittleren Körpergewicht von 20 g wurden je  $2 \times 10^6$  Zellen subkutan injiziert und das Tumorwachstum wöchentlich an der Injektionsstelle durch Messung des Tumordurchmessers dokumentiert. Die Tumorgröße wurde als Produkt aus zwei Durchmessern berechnet, wobei einer davon an der breitesten Stelle des Tumors gemessen wurde. Aus ethischen Gründen wurden die Mäuse bei Erreichen einer Maximaltumorgröße von  $300 \text{ mm}^2$  getötet. Die Injektion der Zellen und die tierärztliche Betreuung des Versuchs wurden vom Tierarzt Herrn Dr. Thilo Spruss (Tierstall der Universität Regensburg) durchgeführt.

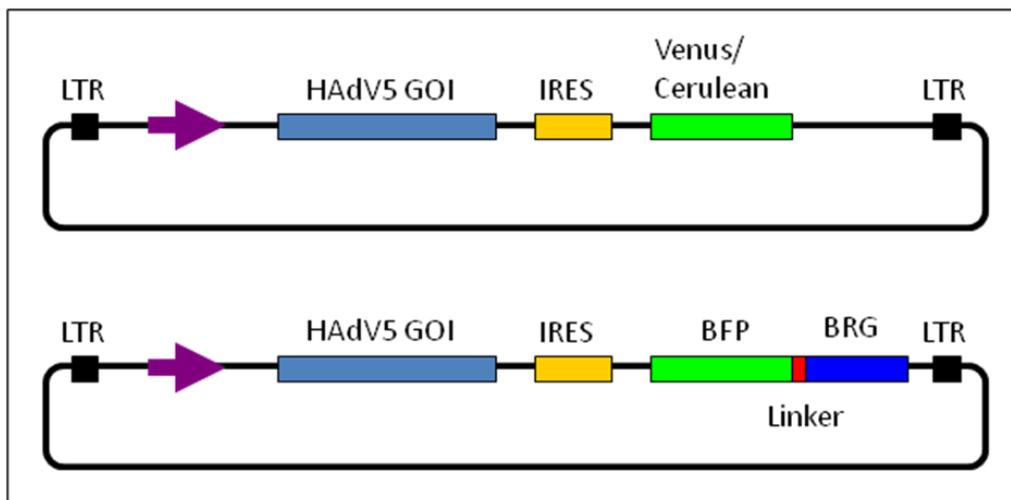
## 5. ERGEBNISSE

### 5.1. Etablierung eines lentiviralen Vektorsystems zur Transduktion adenoviraler Onkogene

Zu *in vitro*-Untersuchungen des transformierenden Potenzials von HAdV5 hat sich das gezielte Einbringen seiner viralen Onkogene durch Transfektion der Zielzellen über viele Jahre zur gängigen Methodik etabliert, wobei in den zahlreichen früheren Arbeiten unterschiedliche Transfektionsmethoden zum Einsatz kamen. Allen Methoden ist gemeinsam, dass die Transfektion von DNA ineffizient sein kann und zudem oft nur eine transiente Expression der Zielgene erreicht wird. Eine Alternative für den Gentransfer stellen inzwischen lentivirale Vektoren dar, deren Verwendung die stabile Genexpression in Zielzellen ermöglicht. Diese Vektoren leiten sich beispielsweise von HIV-1 ab, dessen Genom so modifiziert ist, dass resultierende Viruspartikel replikationsinkompetent sind, wodurch die Sicherheit im Umgang mit diesem System gewährleistet wird. Durch Pseudotypisierung der Vektoren mit dem G-Protein des Rhabdovirus VSV wird eine spezie- und gewebsübergreifende Transduktion von sich teilenden wie auch ruhenden Zellen erzielt (Beyer *et al.*, 2002; Dull *et al.*, 1998; Naldini *et al.*, 1996).

Um die Onkogene E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 (HAdV5) effizient in Zielzellen zu transferieren und dort stabil zu exprimieren, wurden die adenoviralen Sequenzen in der vorliegenden Arbeit in das so genannte LeGO-System lentiviraler Vektoren eingefügt (Abbildung 7) (Weber *et al.*, 2008). Wichtige Komponenten dieses Vektorsystem sind neben den SIN-LTRs (*self-inactivating long terminal repeats*) und einer MCS (*multiple cloning site*), die unter der Kontrolle des SFFV-Promotors (SFFV = *Spleen focus-forming virus*) steht, eine IRES (*internal ribosomal entry site*) sowie ein Fluoreszenzmarkergen. Der Fluoreszenzmarker ermöglicht die Detektion erfolgreich transduzierter Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie. Die E1A-Sequenz wurde zunächst in den so genannten LeGO-Vektor iV2 mit dem gelb fluoreszierenden Marker *Venus* eingesetzt, während die Sequenzen E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 separat voneinander in den LeGO-Vektor iCer2 eingefügt wurden, dessen Marker *Cerulean* bei Expression blau fluoresziert. Die resultierenden Konstrukte wurden mit LeGO-iV2-E1A, LeGO-iCer2-E1B-55K, LeGO-iCer2-E4orf3 und LeGO-iCer2-E4orf6 benannt. Nach ersten Tests der Vektoren zeigte sich, dass

neben dem Fluoreszenzmarkergen ein Antibiotikaresistenzgen hilfreich für die Selektion stabil transduzierter Zellen wäre. Daher wurden die adenoviralen Onkogene E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 zusätzlich in den LeGO-Vektor iBLB2 eingesetzt, der sowohl das Fluoreszenzmarkergen BFP als auch ein Antibiotikaresistenzgen (Blasticidin S) enthält, wobei die jeweiligen Sequenzen durch eine Linkersequenz aus acht Aminosäuren (Ala, Leu, Gly, Ala, Ala, Ala, Gly, Gly) verbunden sind. Die so hergestellten Konstrukte wurden mit LeGO-iBLB2-E1B-55K, LeGO-iBLB2-E4orf3 sowie LeGO-iBLB2-E4orf6 bezeichnet.



**Abb. 7: Schematische Darstellung der LeGO-Vektoren**

Adenovirale Onkogene wurden in das LeGO-System lentiviraler Vektoren eingefügt. Die Abbildung zeigt die erste Generation von LeGO-Konstrukten (oben), die neben den adenoviralen Sequenzen E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 die Fluoreszenzmarkergene *Venus* oder *Cerulean* enthält. Darüber hinaus ist die zweite Generation von Konstrukten (unten) dargestellt, die zusätzlich zu den adenoviralen Sequenzen das Fluoreszenzmarkergen BFP sowie ein Resistenzgen gegen Blasticidin S enthält. LTR = *long terminal repeat*; GOI = *gene of interest*; IRES = *internal ribosomal entry site*; BFP = *blue fluorescent protein*; BRG = Blasticidinresistenzgen.

Die Konstrukte LeGO-iV2-E1A, LeGO-iCer2-E1B-55K, LeGO-iCer2-E4orf3 und LeGO-iCer2-E4orf6 wurden zunächst für Transformationsexperimente an primären Nierenzellen neugeborener Ratten verwendet (5.2.). Die Konstrukte LeGO-iV2-E1A, LeGO-iBLB2-E1B-55K, LeGO-iBLB2-E4orf3 sowie LeGO-iBLB2-E4orf6 kamen anschließend in Transformationsexperimenten an primären humanen Zellen zum Einsatz (5.3. und 5.4.). Dazu wurden die Vektoren zuvor mit Hilfe dreier Hilfsplasmide und der Zelllinie HEK293T in infektiöse Viruspartikel verpackt und mittels Durchflusszytometrie der jeweilige Virustiter bestimmt. Die Benennung der verschiedenen Viruspartikel erfolgte analog zur Benennung der LeGO-Konstrukte.

## **5.2. Transformationsexperimente an primären Nierenzellen neugeborener Ratten**

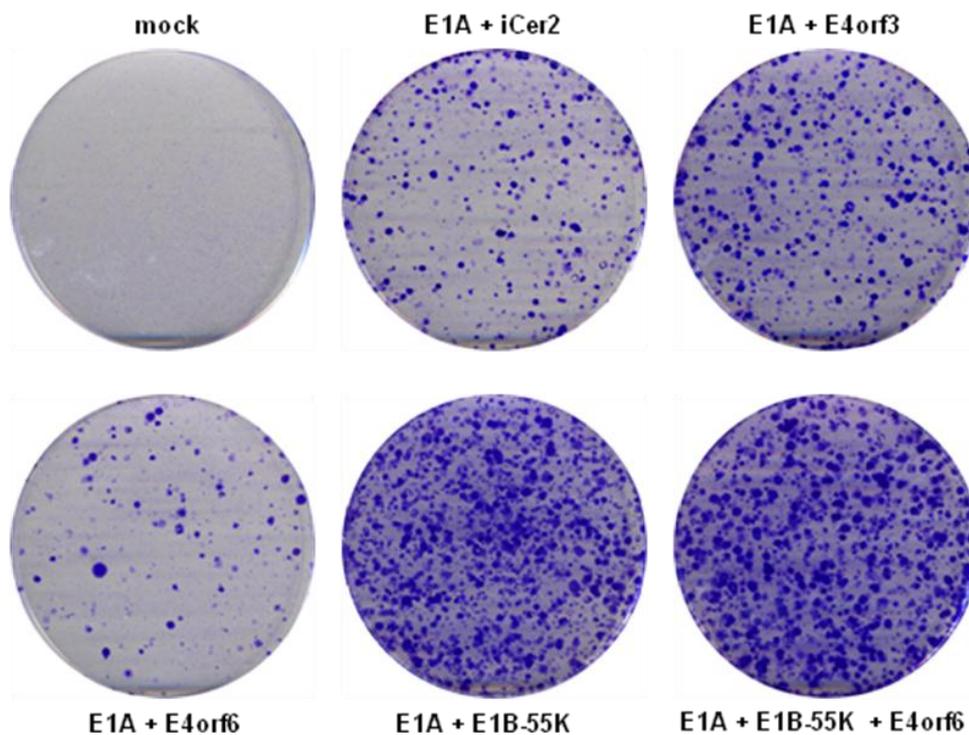
Bisherige Arbeiten zum Transformationspotenzial von HAdV5 in primären Nierenzellen basierten überwiegend auf der Transfektion von Plasmiden, die die Sequenzen der adenoviralen Onkogene enthielten. Dass das Onkoprotein E1A allein in der Lage ist, solche Zellen zu immortalisieren oder partiell zu transformieren, ist inzwischen anerkanntes Faktum. Häufig ist die alleinige Transformation durch E1A jedoch ineffizient und unvollständig. Das Onkoprotein E1B-55K unterstützt jedoch in Kooperation mit E1A den Transformationsprozess. Die gleichzeitige Expression beider Gene erhöht die Transformationseffizienz und führt zu einem vollständig transformierten Phänotyp der behandelten Zellen (Graham, 1984; Shenk, 2001). Auch die Onkoproteine E4orf3 und E4orf6 sind in der Lage, die Zelltransformation noch zusätzlich zu verstärken (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997; Nevels *et al.*, 1999a; Nevels *et al.*, 1999b). Dem klassischen Konzept viraler Onkogenese entsprechend zeigen Zellen, die durch Behandlung mit E1A und E1B-55K transformiert wurden, stabile Expression beider Onkogene (Graham *et al.*, 1977; Hutton *et al.*, 2000; Zantema *et al.*, 1985). Bezüglich der Transformation durch Behandlung von Zellen mit E1A und E4orf3 oder E4orf6 wird jedoch berichtet, dass keines der E4-Proteine in den transformierten Zellen nachzuweisen ist, was für eine Transformation nach dem „Hit & Run“-Konzept spricht (Nevels *et al.*, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden ähnliche Experimente an primären Nierenzellen neugeborener Ratten durchgeführt, in denen die zuvor hergestellten LeGO-Konstrukte eingesetzt wurden. Durch die lentivirale Transduktion der Rattenzellen sollte im Gegensatz zu früheren Studien eine stabile Expression aller Zielgene (E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6) erreicht werden.

### **5.2.1. Die lentivirale Transduktion der Onkogene E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 resultiert in einer hohen Transformationseffizienz von BRK-Zellen**

Wie unter 5.2. beschrieben, wurden primäre Nierenzellen neugeborener Ratten mit Lentiviruspartikeln transduziert, in denen die LeGO-Konstrukte verpackt waren. Dazu wurden die Viren in den Kombinationen iV2 + iCer2 (*mock* = Negativkontrolle), iV2-E1A + iCer2, iV2-E1A + iCer2-E4orf3, iV2-E1A + iCer2-E4orf6, iV2-E1A + iCer2-E1B-55K sowie

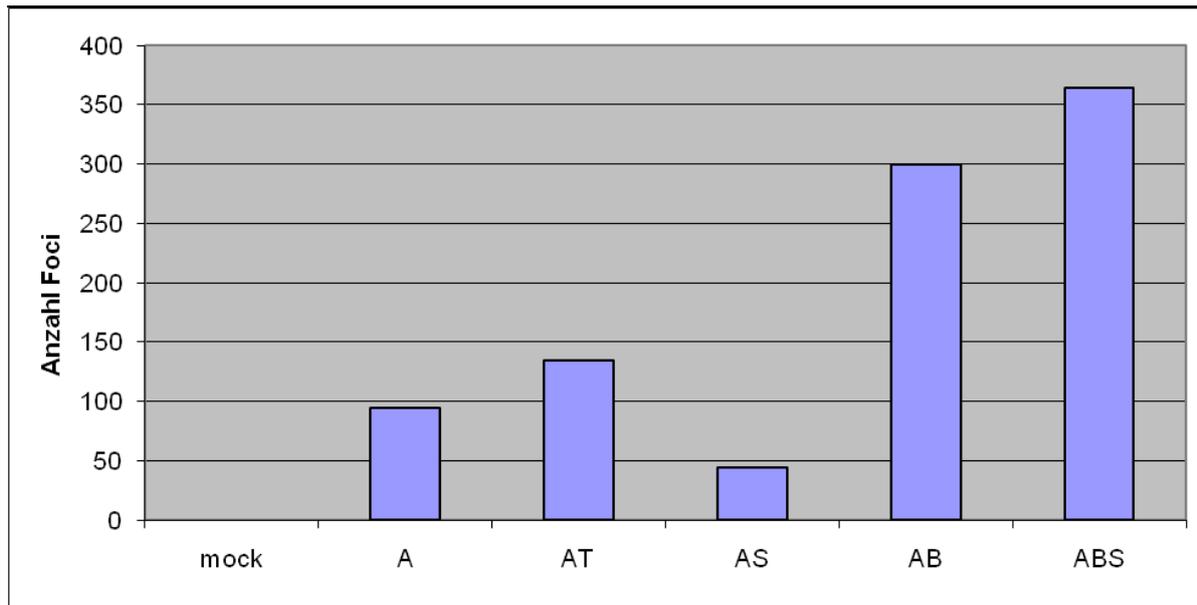
iV2-E1A + iCer2-E1B-55K + iCer2-E4orf6 verwendet. Pro Virustyp wurden je 200.000 Viruspartikel/350.000 Zellen eingesetzt. Nach Transduktion der Zellen wurden diese so lange kultiviert, bis sich distinkte *Foci* morphologisch veränderter (transformierter) Zellen gebildet hatten, die mit Kristallviolett angefärbt werden konnten, um ihre Anzahl zu bestimmen (Abbildungen 8 und 9).



**Abb. 8: Transformation von BRK-Zellen durch adenovirale Onkogene (Kristallviolett färbung)**

BRK-Zellen wurden mit den adenoviralen Onkogenen E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 lentiviral transduziert. Morphologisch transformierte Zellen bildeten dichte Kolonien, die mit Kristallviolett angefärbt werden konnten. Die Lentiviruspartikel wurden in folgenden Kombinationen eingesetzt: iV2 + iCer2 (*mock*), iV2-E1A + iCer2, iV2-E1A + iCer2-E4orf3, iV2-E1A + iCer2-E4orf6, iV2-E1A + iCer2-E1B-55K und iV2-E1A + iCer2-E1B-55K + iCer2-E4orf6.

Abbildung 8 zeigt, dass die lentivirale Transduktion von BRK-Zellen mit den adenoviralen Onkogenen E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 in hohen Zahlen transformierter Zellkolonien resultierte. Diese erscheinen in der Abbildung als blau-violett gefärbte Punkte. Die veränderte Morphologie der Zellen innerhalb der *Foci* konnte mikroskopisch bestätigt werden (mikroskopische Aufnahmen hier nicht abgebildet), während einzeln verbliebene Zellen des primären Phänotyps keine Koloniebildung zeigten, sondern im Verlauf des Experiments abstarben. Die Transduktion der lentiviralen Konstrukte iV2 und iCer2 (*mock*), die keine adenoviralen Sequenzen enthalten, zog im Gegensatz zur Transduktion der Konstrukte, die Teile des HAdV5-Genoms enthalten, keine Koloniebildung morphologisch transformierter Zellen nach sich.



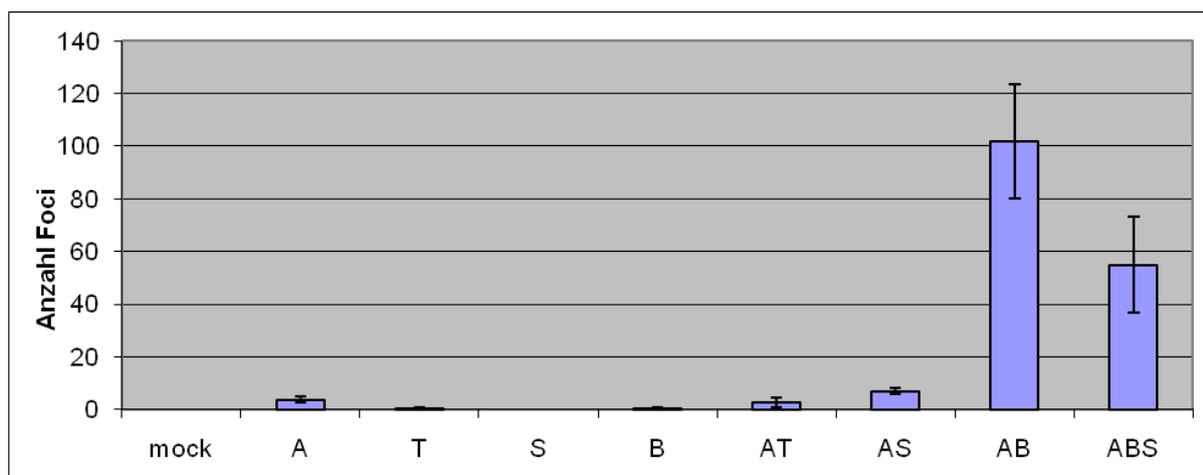
**Abb. 9: Transformation von BRK-Zellen durch adenovirale Onkogene (Anzahl gefärbter Foci)**

Das Diagramm zeigt die absoluten Koloniezahlen morphologisch transformierter BRK-Zellen, die mit den adenoviralen Onkogenen E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 lentiviral transduziert wurden. Die Zählung der Foci wurde nach Kristallviolett-färbung durchgeführt. Die Lentiviruspartikel wurden in folgenden Kombinationen eingesetzt: iV2 + iCer2 (*mock*), iV2-E1A + iCer2 (A), iV2-E1A + iCer2-E4orf3 (AT), iV2-E1A + iCer2-E4orf6 (AS), iV2-E1A + iCer2-E1B-55K (AB) und iV2-E1A + iCer2-E1B-55K + iCer2-E4orf6 (ABS).

In Abbildung 9 sind die absoluten Zahlen der mit Kristallviolett angefärbten Foci morphologisch transformierter Zellen dargestellt. Die Transduktion von E1A und E1B-55K (AB) sowie von E1A, E1B-55K und E4orf6 (ABS) resultierte erwartungsgemäß in hohen Zahlen (AB = 300 Foci, ABS = 364 Foci). Dieses Ergebnis stimmt tendenziell mit den Beobachtungen aus früheren Arbeiten überein (Nevels *et al.*, 1997; Nevels *et al.*, 2001). Die alleinige Transduktion von E1A (A) hatte keine so zahlreiche Koloniebildung zur Folge (94 Foci). Interessanterweise führte die Transduktion von E1A und E4orf3 (AT) sowie von E1A und E4orf6 (AS) zu weniger hohen Koloniezahlen als die Transduktion von E1A und E1B-55K (AB) (AT = 135 Foci, AS = 44 Foci, AB = 300 Foci). Das Ergebnis dieses Experimentes zeigt insgesamt, dass die lentivirale Transduktion der adenoviralen Onkogene E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 zur Transformation von BRK-Zellen eine funktionale und effiziente Methode darstellt.

### 5.2.2. Die Transduktion verschiedener Kombinationen der Onkogene E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 hat unterschiedlich hohe Transformationsraten von BRK-Zellen zur Folge

Um die unter 5.2.1. erzielten Ergebnisse zu reproduzieren, wurden erneut BRK-Zellen mit Lentiviruspartikeln transduziert. In drei voneinander unabhängigen Ansätzen wurden die Viren dazu in den Kombinationen iV2 + iCer2 (*mock*), iV2-E1A + iCer2, iV2 + iCer2-E4orf3, iV2 + iCer2-E4orf6, iV2 + iCer2-E1B-55K, iV2-E1A + iCer2-E4orf3, iV2-E1A + iCer2-E4orf6, iV2-E1A + iCer2-E1B-55K und iV2-E1A + iCer2-E1B-55K + iCer2-E4orf6 eingesetzt. Dabei wurden für jeden Virustyp je 100.000 Viruspartikel/350.000 Zellen verwendet. Anschließend wurden die transduzierten Zellen so lange kultiviert, bis Kolonien morphologisch transformierter Zellen mit Kristallviolett angefärbt und ausgezählt werden konnten (Abbildung 10).



**Abb. 10: Transformation von BRK-Zellen durch adenovirale Onkogene (Anzahl gefärbter Foci)**

Das Diagramm zeigt Mittelwerte der Koloniezahlen morphologisch transformierter BRK-Zellen dreier unabhängiger Ansätze, in denen die Zellen mit den adenoviralen Onkogenen E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 lentiviral transduziert wurden. Die Zählung der *Foci* wurde nach Kristallviolett färbung durchgeführt. Die Lentiviruspartikel wurden in folgenden Kombinationen eingesetzt: iV2 + iCer2 (*mock*), iV2-E1A + iCer2 (A), iV2 + iCer2-E4orf3 (T), iV2 + iCer2-E4orf6 (S), iV2 + iCer2-E1B-55K (B), iV2-E1A + iCer2-E4orf3 (AT), iV2-E1A + iCer2-E4orf6 (AS), iV2-E1A + iCer2-E1B-55K (AB) und iV2-E1A + iCer2-E1B-55K + iCer2-E4orf6 (ABS).

Mittelwerte der absoluten Koloniezahlen der drei voneinander unabhängigen Transformationsexperimente sind in Abbildung 10 dargestellt. Da in diesem Ansatz weniger Viruspartikel für die Transduktion der Zellen verwendet wurden als unter 5.2.1. beschrieben, sind die Zahlen insgesamt niedriger. Im Falle der alleinigen Transduktion von E1A (A) wurden nur wenige *Foci* gezählt (4 *Foci*). Damit ist in Relation zu den Koloniezahlen, die durch andere Kombinationen von Onkogenen in diesem Ansatz erzielt wurden, das unter

5.2.1. beschriebene Ergebnis tendenziell bestätigt. Die alleinige Transduktion von E4orf3 (T), E4orf6 (S) sowie E1B-55K (B) hatte keine Koloniebildung zur Folge. Dies zeigt, dass eine Transformation von BRK-Zellen durch ausschließliche Expression dieser Onkogene nicht möglich ist. Ihr transformierendes Potenzial scheint lediglich von unterstützender bzw. verstärkender Natur zu sein, wenn die Immortalisierung oder partielle Transformation der Zellen durch die Expression von E1A vorausgeht. Im Falle der Transduktion von E1A mit E4orf3 (AT) sowie von E1A mit E4orf6 (AS) wurden niedrige Koloniezahlen erreicht (AT = 3 *Foci*, AS = 7 *Foci*). Damit ist das Ergebnis, das unter 5.2.1. beschrieben wurde, ebenfalls tendenziell bestätigt. Somit scheint auch die Zelltransformation durch stabile Expression dieser Onkogenkombinationen nur begrenzt effizient zu sein. Die Transduktion von E1A zusammen mit E1B-55K (AB) bzw. von E1A mit E1B-55K und E4orf6 (ABS) resultierte im hier gezeigten Experiment in den höchsten Koloniezahlen (AB = 102 *Foci*, ABS = 55 *Foci*). Auch damit ist in der Tendenz das unter 5.2.1. dargestellte Ergebnis belegt, wobei die höchste Koloniezahl dort im Falle der Zellen erreicht wurde, die mit E1A, E1B-55K und E4orf6 transduziert wurden. Grundsätzlich lässt sich jedoch ableiten, dass die Expression von E1A und E1B-55K zu einer überaus effizienten Transformation von BRK-Zellen führt. Wie die Koloniezahlen dieses sowie des initialen Experimentes zeigen, ist stabile Expression der adenoviralen Onkogene dem Transformationsprozess in diesem Falle offenbar äußerst zuträglich. Ob die stabile Expression von E4orf6 diesen Vorgang fördert, ist aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse der beiden hier gezeigten Experimente fraglich.

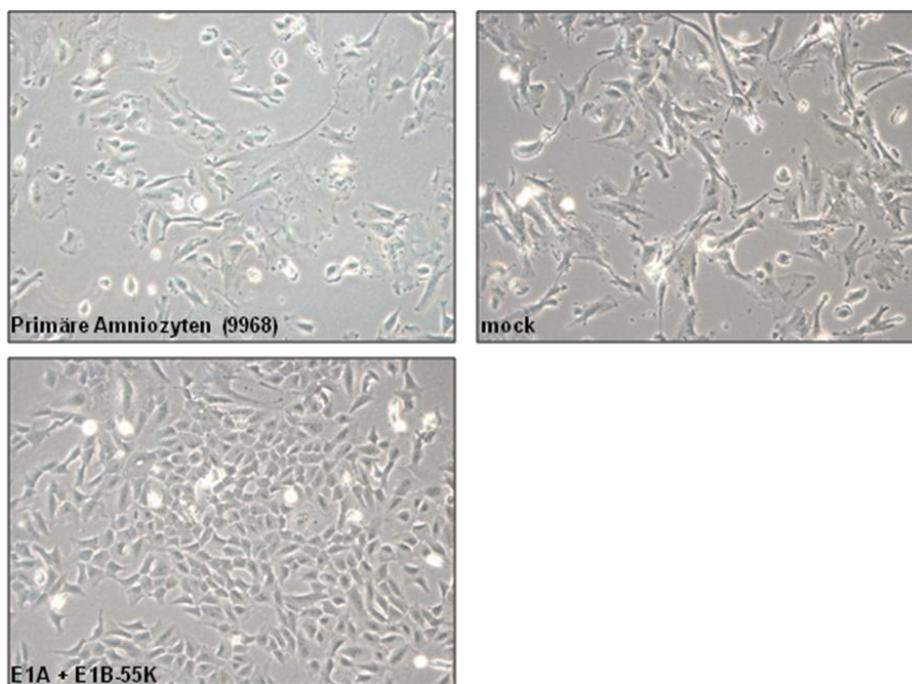
Nach erfolgreicher Anwendung der LeGO-Vektoren in BRK-Zellen sollte dieses System auch in Experimenten an humanen Primärzellen eingesetzt werden.

### **5.3. Transformationsexperimente an primären humanen Amniozyten**

Nur in seltenen Fällen ist es bis heute gelungen, humane Primärzellen *in vitro* durch adenovirale Onkogene von HAdV5 zu transformieren. Die wenigen Erfolge, von denen die Literatur berichtet, beruhen auf der Transfektion verschiedener embryonaler Zellen mit subgenomischer DNA, wobei in jenen Studien die Onkogene der E1-Region Bestandteil der transfizierten DNA waren (Fallaux *et al.*, 1996; Graham *et al.*, 1977; Schiedner *et al.*, 2000). Quelle für eine Vielzahl unterschiedlicher embryonaler Zellen ist beispielsweise das humane Fruchtwasser. Da solche Zellen bereits erfolgreich transformiert werden konnten (Schiedner *et al.*, 2000), sollte dieser Ansatz in der vorliegenden Arbeit reproduziert werden.

### 5.3.1. Die Transduktion der Onkogene E1A und E1B-55K führt zur morphologischen Transformation von Amniozyten

In einem initialen Experiment wurden primäre Amniozyten, die mit der Probennummer 9968 bezeichnet waren, lentiviral transduziert. Dazu wurden je 100.000 Viruspartikel/200.000 Zellen in den Kombinationen iV2 + iBLB2 (*mock*) sowie iV2-E1A + iBLB2-E1B-55K eingesetzt. Die Verwendung des Vektors iBLB2 ermöglichte in diesem Ansatz die antibiotische Selektion von Zellen, die jenes Konstrukt stabil in ihr Genom integriert hatten. Morphologie und Wachstumsverhalten der Zellen wurden mikroskopisch beobachtet (Abbildung 11).

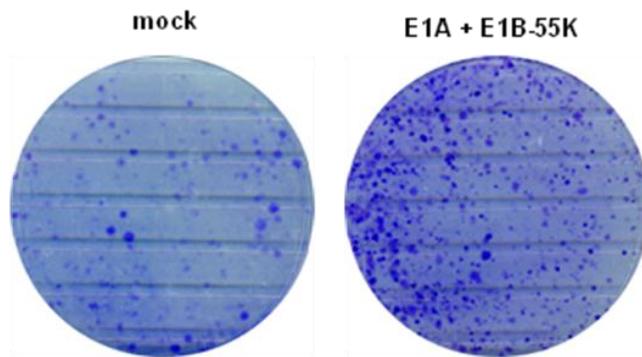


**Abb. 11: Morphologie von Amniozyten (9968) nach Transduktion mit adenoviralen Onkogenen**

Amniozyten mit der Probennummer 9968 wurden mit den adenoviralen Onkogenen E1A und E1B-55K lentiviral transduziert. Transformierte Zellen zeigten im Vergleich zu unbehandelten Zellen sowie mit Leervektoren behandelten Zellen eine veränderte Morphologie. Darüber hinaus bildeten diese Zellen Kolonien. Die Lentiviruspartikel wurden in folgenden Kombinationen eingesetzt: iV2 + iBLB2 (*mock*) und iV2-E1A + iBLB2-E1B-55K. Vergrößerung x 100.

Die mit E1A und E1B-55K behandelten Amniozyten zeigten bereits nach einigen Tagen im Vergleich zu den Primärzellen sowie den mit Leervektoren transduzierten Zellen eine veränderte Morphologie. Im Gegensatz zu den Primärzellen waren die mit adenoviralen Onkogenen behandelten Zellen deutlich kleiner. Diese morphologische Transformation ging mit der Neigung der Zellen einher, pflastersteinartige, dichte Kolonien zu bilden (Abbildung 11). Nach etwa zwei bis drei Wochen waren die *Foci* so groß, dass sie durch

Kristallviolett färbung makroskopisch deutlich sichtbar gemacht werden konnten (Abbildung 12).



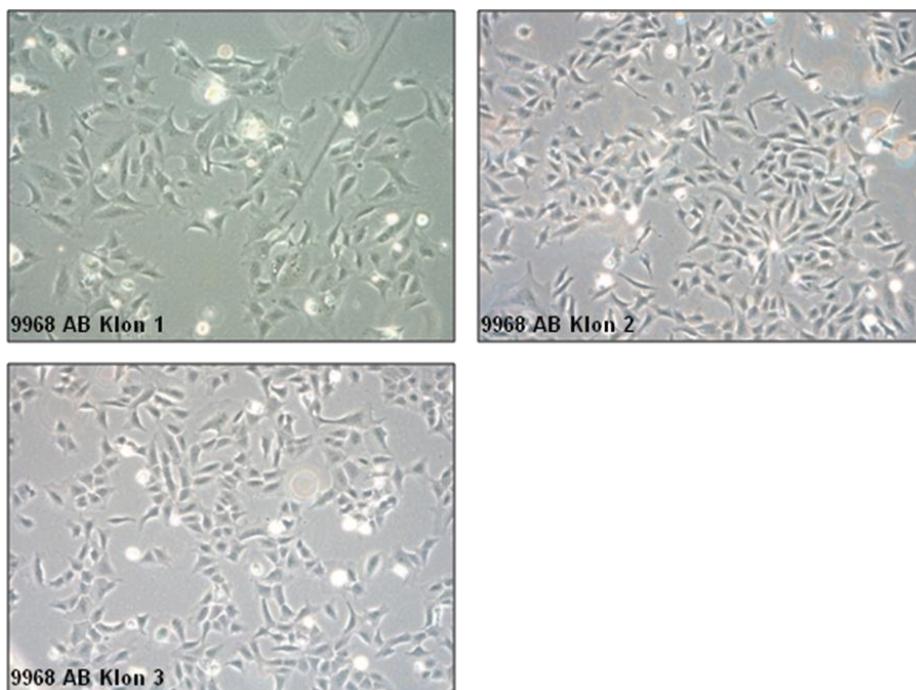
**Abb. 12: Transformation von Amniozyten (9968) durch adenovirale Onkogene (Kristallviolett färbung)**  
Amniozyten mit der Probennummer 9968 wurden mit den adenoviralen Onkogenen E1A und E1B-55K lentiviral transduziert. Morphologisch transformierte Zellen wuchsen im Vergleich zu Zellen, die mit Leervektoren behandelt wurden, in dichten Kolonien. Diese wurden durch Kristallviolett färbung sichtbar gemacht. Die Lentiviruspartikel wurden in folgenden Kombinationen eingesetzt: iV2 + iBLB2 (*mock*) und iV2-E1A + iBLB2-E1B-55K.

Abbildung 12 zeigt die mit Kristallviolett angefärbten Zellkolonien morphologisch transformierter Amniozyten nach Transduktion von E1A und E1B-55K. Die mit Leervektoren behandelten Zellen (*mock*) waren ebenfalls fähig, im Verlaufe des Experiments an wenigen Stellen der Kulturschale in dichteren Subpopulationen zu wachsen. Dadurch wird auch hier der Eindruck einer Koloniebildung erweckt. Jedoch zeigten sich diese Zellen bei mikroskopischer Betrachtung im Gegensatz zu den mit Onkogenen behandelten Zellen morphologisch völlig unauffällig. Das Ergebnis dieses Experimentes verdeutlicht, dass die lentivirale Transduktion von E1A und E1B-55K in hoch effizienter Weise eine morphologische Transformation und ein Koloniewachstum humaner Amniozyten verursacht.

### **5.3.2. Aus Kulturen transformierter Amniozyten sind monoklonale AB-Zelllinien isolierbar**

Um die Eigenschaften morphologisch transformierter Amniozyten genauer untersuchen zu können, wurde der unter 5.3.1. beschriebene Ansatz noch einmal wiederholt. Ziel dabei war, ausgewählte Kolonien transformierter Zellen zu isolieren, um diese zu monoklonalen Zelllinien heranzuzüchten. Dazu wurden die Amniozyten 9968 erneut mit je 100.000 Lentiviruspartikeln/250.000 Zellen in den Kombinationen iV2 + iBLB2 (*mock*) sowie iV2-E1A + iBLB2-E1B-55K behandelt. Nachdem morphologisch transformierte Zellen im Ansatz

E1A/E1B-55K (AB) dichte Kolonien ausreichender Größe gebildet hatten, wurden die Zellen ausgewählter *Foci* isoliert und getrennt voneinander weiter kultiviert (Abbildung 13).



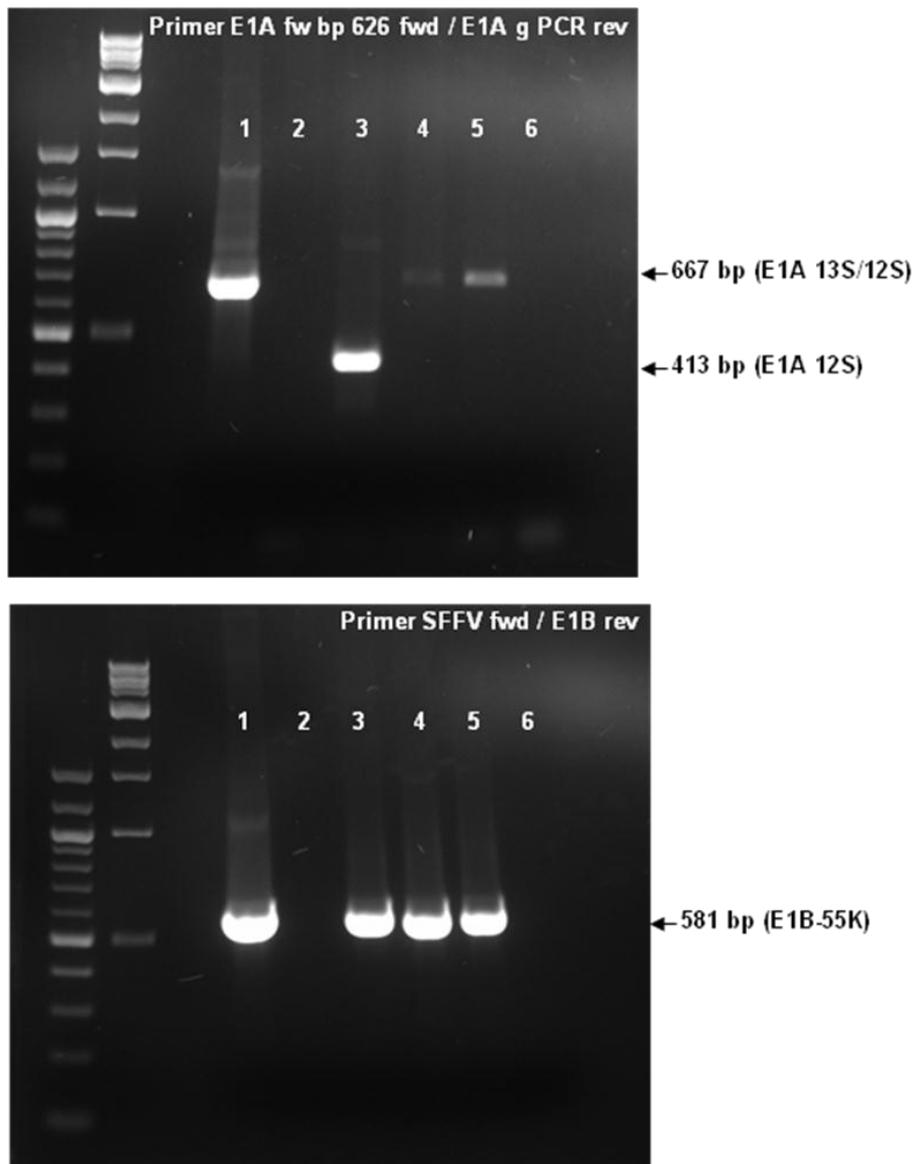
**Abb. 13: Morphologie transformierter Amniozyten-Klone**

Nach lentiviraler Transduktion der Amniozyten 9968 war es möglich, morphologisch transformierte Zellklone zu isolieren und getrennt voneinander zu kultivieren. Für die Transduktion wurden folgende Lentiviruspartikel eingesetzt: iV2-E1A + iBLB2-E1B-55K (AB). Die resultierenden Zellklone wurden mit 9968 AB Klon 1, 2 und 3 bezeichnet. Vergrößerung x 100.

Bei der Isolierung morphologisch transformierter Amniozyten-Klone wurden drei stabil wachsende Kulturen gewonnen, die mit 9968 AB Klon 1, Klon 2 und Klon 3 bezeichnet wurden. Bei mikroskopischer Betrachtung zeigten diese Zellen eine annähernd identische Form und Größe. Aufnahmen der Klone sind in Abbildung 13 dargestellt. Die lentivirale Transduktion der Onkogene E1A und E1B-55K resultiert demnach in stabil wachsenden Kulturen morphologisch transformierter Amniozyten.

### **5.3.3. Die transformierten AB-Zellklone exprimieren die transduzierten Onkogene und zeigen eine veränderte Wachstumsrate**

Die Kulturen 9968 AB Klon 1, 2 und 3 wurden mittels PCR auf die Integration der transduzierten Sequenzen E1A und E1B-55K ins Zellgenom untersucht. Ferner wurde die Expression dieser Gene im *Western Blot*-Verfahren analysiert (Abbildungen 14 und 15).

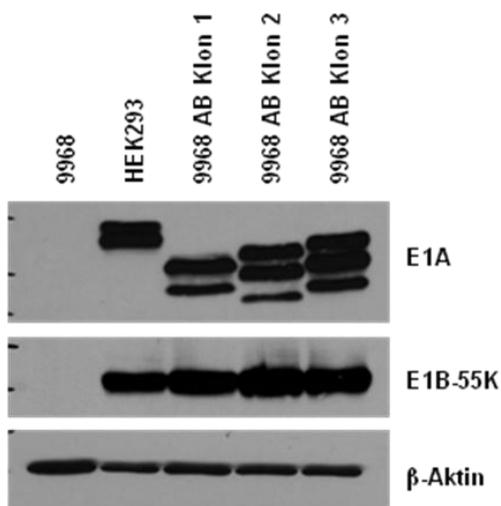


#### Abb. 14: Nachweis von E1A- und E1B-55K-DNA

Genomische DNA wurde aus 9968-Klonen extrahiert und mittels PCR und Gelelektrophorese auf die Integration der Sequenzen E1A und E1B-55K untersucht. E1A wurde durch drei unterschiedlich große Fragmente nachgewiesen (667, 551 oder 413 bp), während E1B-55K über ein Fragment mit der Länge von 581 bp zu detektieren war. Als Positivkontrollen wurden die lentiviralen Vektoren iV2-E1A bzw. iBLB2-E1B-55K verwendet. Als Negativkontrolle diente DNA der Primärzellen. Je 200 ng DNA wurden in der PCR eingesetzt. Die Proben wurden in folgender Reihenfolge auf das Gel aufgetragen: 1 = Vektor (Positivkontrolle), 2 = primäre Amniozyten 9968 (Negativkontrolle), 3 = 9968 AB Klon 1, 4 = 9968 AB Klon 2; 5 = 9968 AB Klon 3, 6 = H<sub>2</sub>O.

Genomische DNA wurde aus den 9968-Klonen extrahiert und einer PCR unterzogen, in der spezifische Primer den Nachweis der Sequenzen E1A und E1B-55K ermöglichten. Die PCR-Produkte wurden anschließend in Agarosegelen aufgetrennt, die in Abbildung 14 gezeigt sind. Die Vektoren iV2-E1A und iBLB2-E1B-55K dienten als Positivkontrollen, während DNA der Primärzellen als Negativkontrolle verwendet wurde. Der Nachweis der E1A-Sequenz konnte aufgrund der verwendeten Primer anhand dreier verschiedener DNA-Fragmente erfolgen (667, 551 oder 413 bp). Dies ist dadurch begründet, dass E1A-RNA bei der

Herstellung der lentiviralen Partikel iV2-E1A nach alternativem Spleißen in mindestens drei unterschiedlichen Formen (13S mit 12S, 13S oder 12S) in die Virushülle verpackt werden kann. Dabei entsteht eine Mischung von Viruspartikeln. Ihre Transduktion führt in Folge zur Expression der verschiedenen E1A-Spezies in den behandelten Zellen. Die untersuchten Klone zeigten hauptsächlich Integration der ungespleißten E1A-Form 13S/12S (Klone 2 und 3), während in Klon 1 die 12S-Form nachgewiesen werden konnte. Der Nachweis von E1B-55K erfolgte anhand eines 581 bp großen Fragmentes, das im Falle aller drei Klone detektierbar war.



**Abb. 15: Expression von E1A und E1B-55K**

Gesamtzellextrakte der 9968-Klone wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western Blot*-Verfahren auf die Expression der Proteine E1A und E1B-55K untersucht. Als Negativkontrolle wurden primäre Amniozyten 9968 verwendet. HEK293-Zellen dienen als Positivkontrolle. Folgende Gesamtproteinmengen wurden auf 12%ige Gele geladen: E1A = 50 µg, E1B-55K = 25 µg, β-Aktin = 10 µg. Für die Detektion wurden die Antikörper anti-E1A (M58), anti-E1B-55K (2A6) und anti-β-Aktin (AC-15) verwendet.

Gesamtzellextrakte der 9968-Klone wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels *Western Blot*-Verfahren auf die Anwesenheit der Proteine E1A und E1B-55K untersucht. Die dabei erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt. Ein Extrakt der Primärzellen diente als Negativkontrolle, während ein Extrakt der HEK293-Zellen als Positivkontrolle verwendet wurde. Durch den für die Detektion von E1A verwendeten Antikörper konnten ebenfalls unterschiedliche E1A-Spezies erkannt werden. E1A-Expression wurde im Falle der HEK293-Zellen wie auch in allen untersuchten Klonen nachgewiesen. Ferner war auch die Expression von E1B-55K sowohl in der Positivkontrolle als auch in den drei Klonen detektierbar. Die Expression von β-Aktin in allen aufgetragenen Proben zeigt, dass gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden.

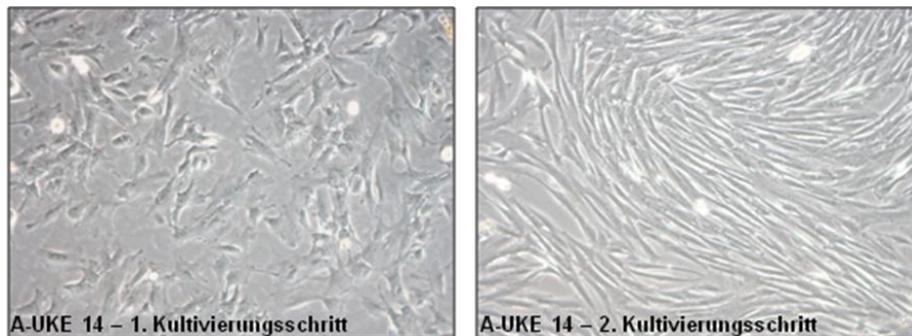
Zusätzlich zu den oben gezeigten Analysen wurden die Wachstumsraten der Klone und der Primärzellen miteinander verglichen. Während sich die Kultur 9968 AB Klon 3 schneller vergrößerte als die Primärkultur, proliferierten die AB-Klone 1 und 2 langsamer als die nicht transduzierten Zellen (Daten hier nicht abgebildet).

Die hier beschriebenen Ergebnisse verdeutlichen, dass der Phänotyp morphologisch transformierter Amniozyten nach Transduktion von E1A und E1B-55K mit einer stabilen Expression jener Onkogene einhergeht. Darüber hinaus zeigen morphologisch transformierte Zellen gegenüber nicht transduzierten Primärzellen zum Teil eine verbesserte Wachstumsrate.

#### **5.3.4. Spezifische Kulturbedingungen erlauben die Isolierung mesenchymaler Stromazellen aus der Mischpopulation von Amniozyten**

Humanes Fruchtwasser enthält eine Vielzahl unterschiedlicher Zellarten und ist daher als Mischpopulation zu betrachten, die sowohl aus undifferenzierten als auch aus differenzierten Zellen aller drei embryonalen Keimschichten besteht. Dabei werden die Zellen aufgrund von morphologischen und biochemischen Charakteristika sowie aufgrund ihres Wachstumsverhaltens in die drei Hauptgruppen E (epitheloide Zellen), F (fibroblastenartige Zellen) und AF (fruchtwasserspezifische Zellen; AF = *amniotic fluid*) eingeteilt (Bossolasco *et al.*, 2006; Gosden, 1983; Hoehn and Salk, 1982; Prusa and Hengstschlager, 2002). Ferner ist bekannt, dass Zellen des humanen Fruchtwassers Marker neuronaler und glialer Zellen sowie Progenitorzellmarker exprimieren (Sakuragawa *et al.*, 1996). Aufgrund der unter 5.3.1. und 5.3.2. beschriebenen Ergebnisse stellte sich die Frage, ob ein Zelltyp oder mehrere Zellspezies innerhalb der Mischpopulation von Amniozyten präferenziell durch die adenoviralen Onkogene E1A und E1B-55K transformierbar ist bzw. sind. Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass die Amniozytenpopulation auch mesenchymale Stromazellen enthält, eine Zellspezies, die im embryonalen und adulten Organismus zu finden ist und aus der Sarkome hervorgehen können (Helman and Meltzer, 2003; In 't Anker *et al.*, 2003; Kaviani *et al.*, 2003; Nombela-Arrieta *et al.*, 2011). Da bekannt ist, dass die Entstehung von Sarkomen in Nagern durch humane Adenoviren induziert werden kann (Graham, 1984), sollte der Fokus auf die Zellspezies der mesenchymalen Stromazellen gerichtet werden. Nach einem modifizierten Protokoll zur Isolierung mesenchymaler Stromazellen aus Amniozyten von Tsai und Kollegen (Tsai *et al.*, 2004) sollte daher jener Zelltyp aus einer frischen Probe humanen Fruchtwassers in zwei Schritten isoliert und nachfolgend lentiviral mit den Onkogenen E1A

und E1B-55K transduziert werden. Die Fruchtwasserprobe war mit A-UKE 14 bezeichnet (Abbildung 16).



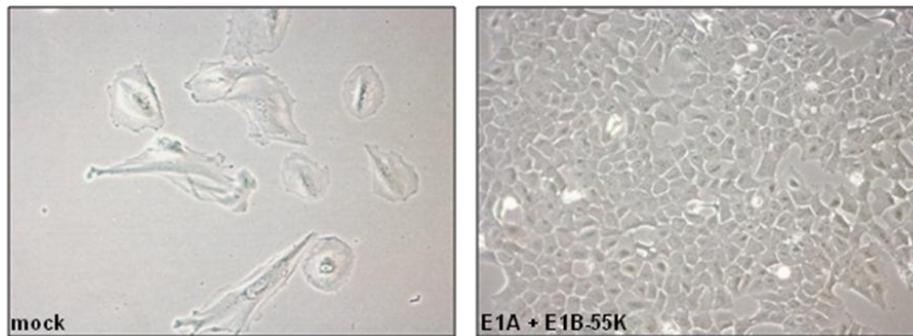
**Abb. 16: Isolierung mesenchymaler Stromazellen aus humanem Fruchtwasser**

Die in der Fruchtwasserprobe A-UKE14 enthaltenen Zellen wurden zunächst unter amniozytenspezifischen Bedingungen kultiviert, wobei eine erste Population adhärenter Zellen am Boden des Kulturgefäßes anhaftete. Nach fünf Tagen wurden die im Überstand verbliebenen Zellen abgenommen und unter Bedingungen kultiviert, die für mesenchymale Stromazellen spezifisch sind. Dabei setzte sich eine zweite Population adhärenter Zellen am Schalenboden ab (Tsai *et al.*, 2004). Die Populationen beider Kultivierungsschritte unterschieden sich deutlich in ihrer Morphologie. Vergrößerung x 100.

Die Isolierung von Zellen aus der Fruchtwasserprobe A-UKE 14 resultierte im zweiten Kultivierungsschritt (hMSC-spezifische Bedingungen) in einer Zellpopulation, die sich morphologisch deutlich von der Population unterschied, die im ersten Kultivierungsschritt (amniozytenspezifische Bedingungen) gewonnen wurde. Mikroskopische Aufnahmen der beiden Zellpopulationen sind in Abbildung 16 dargestellt. Dieses Ergebnis verdeutlicht somit in Übereinstimmung mit der oben angeführten Literatur die Existenz unterschiedlicher Zellspezies im humanen Fruchtwasser.

### **5.3.5. Die Transduktion der Onkogene E1A und E1B-55K führt zur morphologischen Transformation der isolierten mesenchymalen Stromazellen**

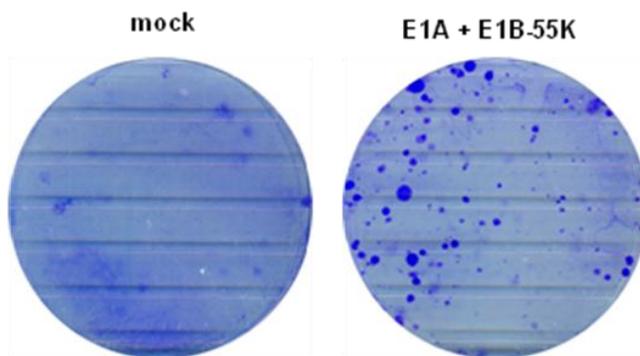
Die im zweiten Kultivierungsschritt aus der Fruchtwasserprobe A-UKE 14 isolierten Zellen wurden nachfolgend lentiviral mit den adenoviralen Onkogenen E1A und E1B-55K transduziert. Dazu wurden je 100.000 Lentiviruspartikel/200.000 Zellen in den Kombinationen iV2 + iBLB2 (*mock*) und iV2-E1A + iBLB2-E1B-55K verwendet. Morphologie und Wachstumsverhalten der transduzierten Zellen wurde mikroskopisch überwacht (Abbildung 17).



**Abb. 17: Morphologie isolierter mesenchymaler Stromazellen nach Transduktion mit adenoviralen Onkogenen**

Die im zweiten Kultivierungsschritt aus der Fruchtwasserprobe A-UKE 14 isolierten mesenchymalen Stromazellen wurden mit den adenoviralen Onkogenen E1A und E1B-55K lentiviral transduziert. Diese Zellen veränderten im Vergleich zu Zellen, die mit Leervektoren behandelt wurden, ihre Morphologie und wuchsen in dichten Kolonien. Die Lentiviruspartikel wurden in folgenden Kombinationen eingesetzt: iV2 + iBLB2 (*mock*) und iV2-E1A + iBLB2-E1B-55K. Vergrößerung x 100.

Die mit E1A und E1B-55K behandelte Kultur isolierter Zellen zeigte bereits nach wenigen Tagen morphologisch transformierte Zellen, die in dichter werdenden Kolonien wuchsen. Diese Erscheinung war im Vergleich dazu in der mit Leervektoren behandelten Kontrollkultur (*mock*) nicht zu beobachten. Mikroskopische Aufnahmen dieser beiden Ansätze sind in Abbildung 17 dargestellt. *Foci* der morphologisch veränderten Zellen wurden nach etwa zwei bis drei Wochen mit Kristallviolett gefärbt (Abbildung 18).



**Abb. 18: Transformation von isolierten mesenchymalen Stromazellen aus dem Fruchtwasser durch adenovirale Onkogene (Kristallviolett färbung)**

Die im zweiten Kultivierungsschritt aus der Fruchtwasserprobe A-UKE 14 isolierten mesenchymalen Stromazellen wurden mit den adenoviralen Onkogenen E1A und E1B-55K lentiviral transduziert. Morphologisch transformierte Zellen wuchsen im Vergleich zu Zellen, die mit Leervektoren behandelt wurden, in dichten Kolonien. Diese wurden mit Kristallviolett gefärbt. Die Lentiviruspartikel wurden in folgenden Kombinationen eingesetzt: iV2 + iBLB2 (*mock*) und iV2-E1A + iBLB2-E1B-55K.

In Abbildung 18 sind die mit Kristallviolett gefärbten Kolonien jener morphologisch transformierten Zellen dargestellt, die aus der Transduktion der adenoviralen Onkogene E1A und E1B-55K resultierten. Koloniebildung war im Vergleich dazu in der Kontrollkultur (*mock*) nicht zu beobachten. Dieses Ergebnis gibt einen ersten Hinweis darauf, dass der

Zelltyp der mesenchymalen Stromazellen eine Spezies innerhalb der Mischpopulation humaner Amniozyten sein kann, die präferenziell durch die Transduktion der adenoviralen Onkogene E1A und E1B-55K transformierbar ist.

Bei der oben beschriebenen Isolierung mesenchymaler Stromazellen aus dem Fruchtwasser mittels spezifischer Kultivierungsmethoden kann die Gewinnung einer reinen Zellpopulation nicht gewährleistet werden. Daher wurden alle folgenden Experimente an kommerziell erworbenen humanen mesenchymalen Stromazellen aus dem Knochenmark durchgeführt (Firma Lonza).

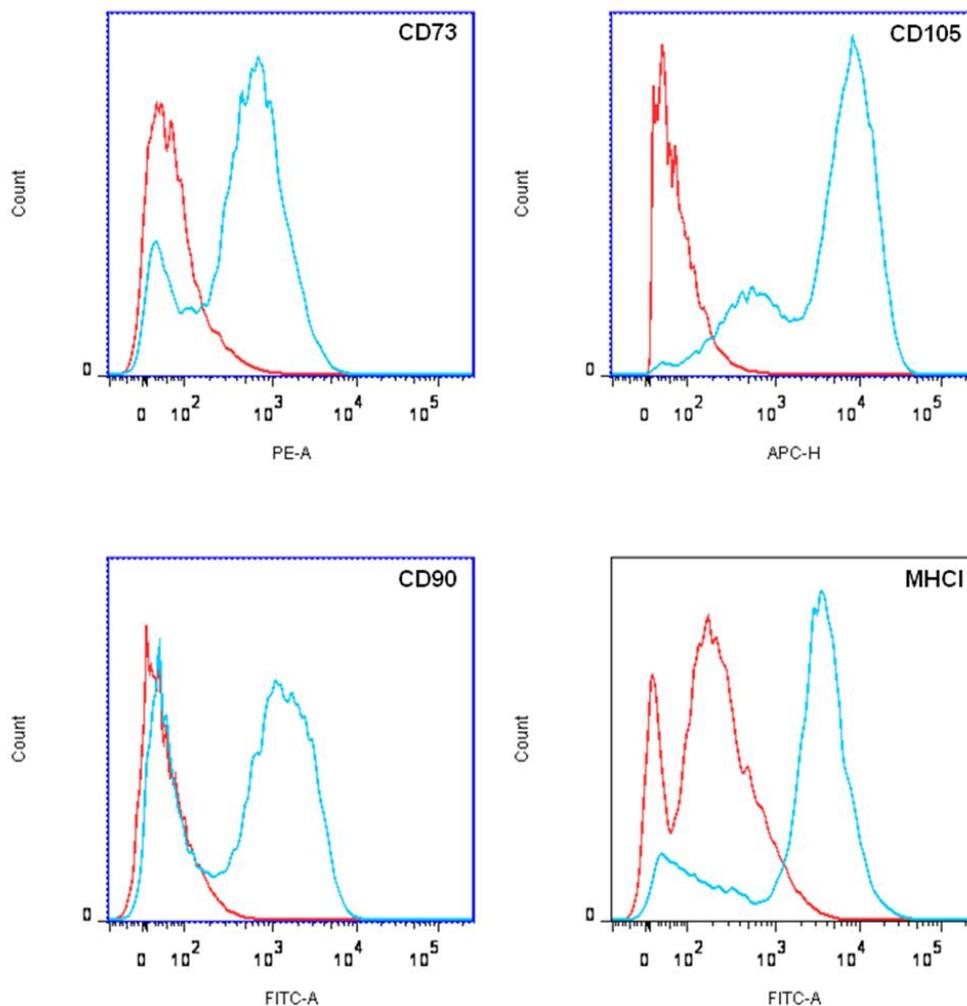
#### **5.4. Transformationsexperimente an primären humanen mesenchymalen Stromazellen aus dem Knochenmark**

Mesenchymale Stromazellen, in der Literatur zum Teil auch als mesenchymale Stammzellen bezeichnet, sind multipotente Progenitorzellen, die in verschiedenen Geweben vorkommen. Sie besitzen das Potenzial, in andere Zellspezies wie Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten zu differenzieren und sind dadurch in der Lage, Gewebe zu reparieren, das durch Verletzung, Krankheit oder Alterung geschädigt wurde (Nombela-Arrieta *et al.*, 2011; Pittenger *et al.*, 1999). Primäre mesenchymale Stromazellen aus dem Knochenmark sollten Transformationsexperimenten mit den adenoviralen Onkogenen E1A, E1B-55K sowie E4orf3 und E4orf6 unterzogen werden. Zuvor wurden die kommerziell erworbenen Zellen jedoch im Hinblick auf die für diesen Zelltyp spezifischen Charakteristika untersucht.

##### **5.4.1. Die kommerziell erworbenen mesenchymalen Stromazellen weisen alle zelltypischen Charakteristika auf**

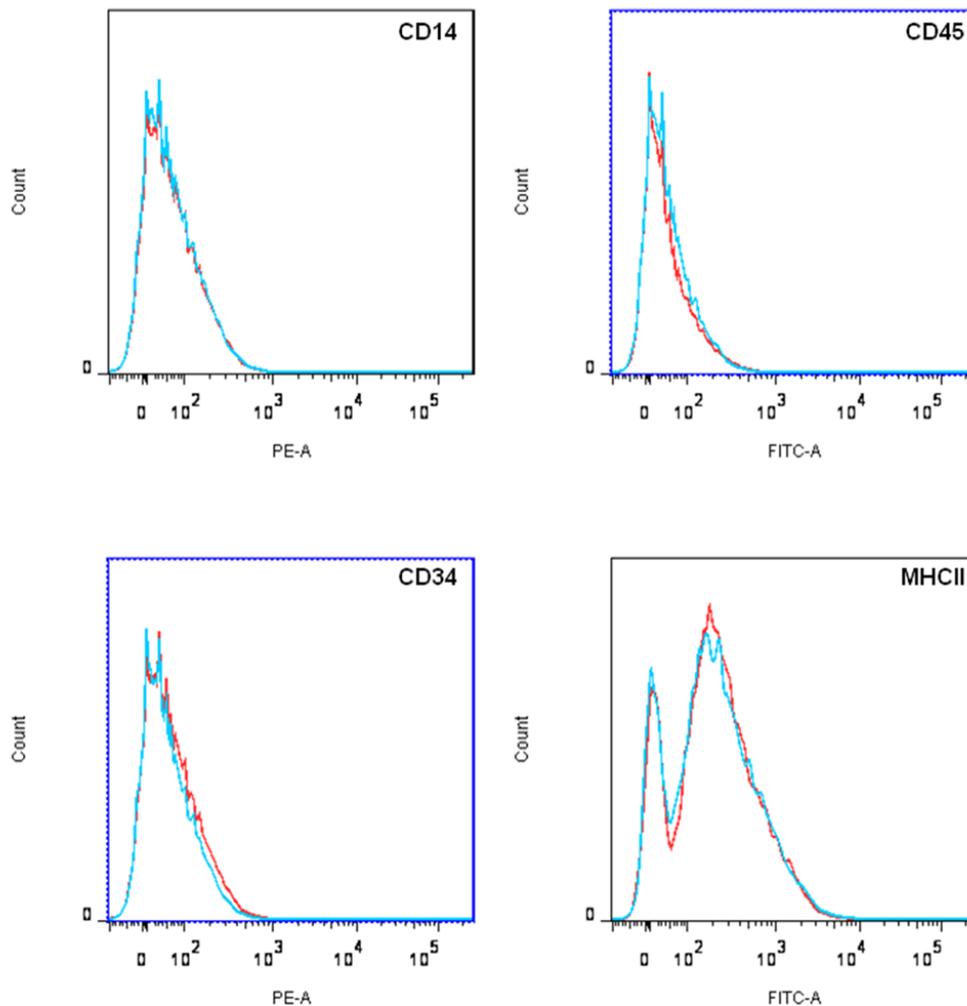
Um die Identität der in der vorliegenden Arbeit verwendeten mesenchymalen Stromazellen festzustellen, wurden diese nach Vorgaben der ISCT (International Society for Cellular Therapy) untersucht. Diese Vorgaben umfassen Plastikadhärenz, Expression verschiedener Oberflächenmarker sowie multipotentes Differenzierungspotenzial der Zellen (Dominici *et al.*, 2006). Das Kriterium der Plastikadhärenz war mit der erfolgreichen Kultivierung der Zellen in Plastik Kulturschalen erfüllt. Darüber hinaus wurde die Expression von Oberflächenmarkern durch Reaktion mit fluorochromgekoppelten Antikörpern und

nachfolgender durchflusszytometrischer Analyse untersucht. Die Zellen sollten zu einem Großteil positiv für die Marker CD73 (Ecto-5'-nucleotidase), CD90 (Thy-1), CD105 (Endoglin) sowie HLA-A, B, C (MHC I) sein (Abbildung 19). Ferner durfte keine Expression der Marker CD14, CD34, CD45 (*leukocyte common antigen*) sowie HLA-DR, DP, DQ (MHC II) detektierbar sein (Abbildung 20). Zusätzlich wurde das adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierungspotenzial der Zellen überprüft (Abbildung 21).



**Abb. 19: Charakterisierung mesenchymaler Stromazellen anhand der Expression der Oberflächenmarker CD73, CD90, CD105 und MHC I**

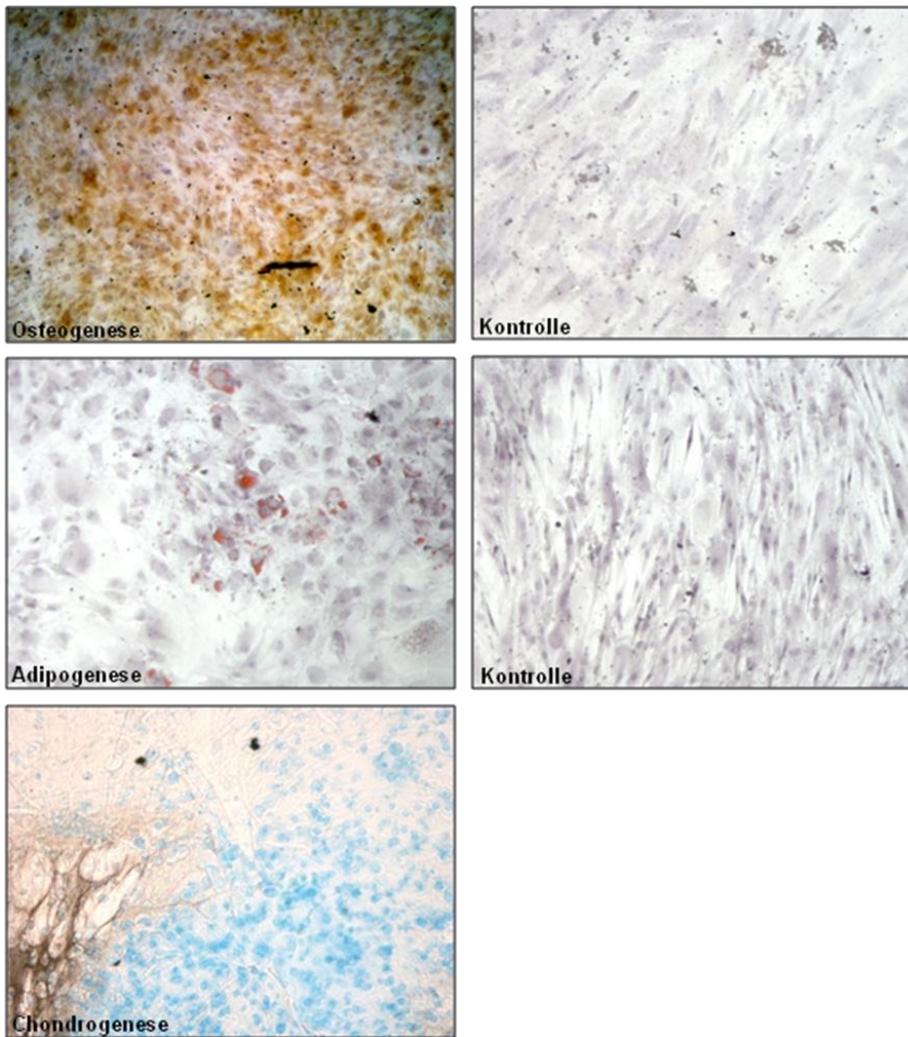
Mesenchymale Stromazellen wurden mit fluorochromgekoppelten Antikörpern gegen CD73, CD90, CD105 und MHC I behandelt und im Vergleich zu Kontrollen durchflusszytometrisch untersucht. Die Rohdaten der Analysen wurden mit der Software FlowJo in Histogramme umgewandelt. Die für die Marker positiven Populationen (blau) heben sich deutlich von den Kontrollpopulationen (rot) ab.



**Abb. 20: Charakterisierung mesenchymaler Stromazellen anhand der Expression der Oberflächenmarker CD14, CD34, CD45 und MHC II**

Mesenchymale Stromazellen wurden mit fluorochromgekoppelten Antikörpern gegen CD14, CD34, CD45 und MHC II behandelt und im Vergleich zu Kontrollen durchflusszytometrisch untersucht. Die Rohdaten der Analysen wurden mit der Software FlowJo in Histogramme umgewandelt. Die für die Marker negativen Populationen (blau) überlappen mit den Kontrollpopulationen (rot).

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen nach Antikörperbehandlung der mesenchymalen Stromazellen sind in den Abbildungen 19 und 20 dargestellt. Die Histogramme belegen eine Expression von CD73, CD90, CD105 und MHC I. Hingegen konnte keine Expression von CD14, CD34, CD45 und MHC II nachgewiesen werden. Damit entspricht das Expressionsmuster von Oberflächenmarkern den für diesen Zelltyp definierten Charakteristika.



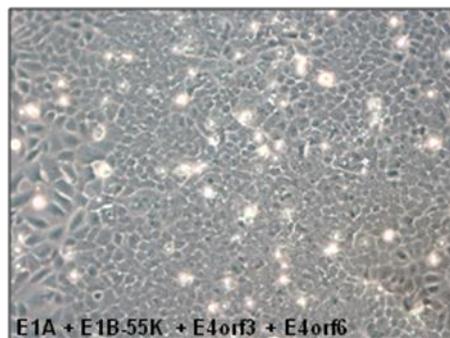
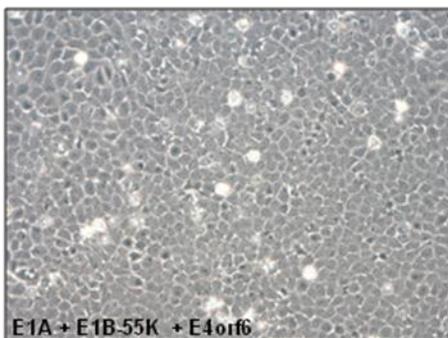
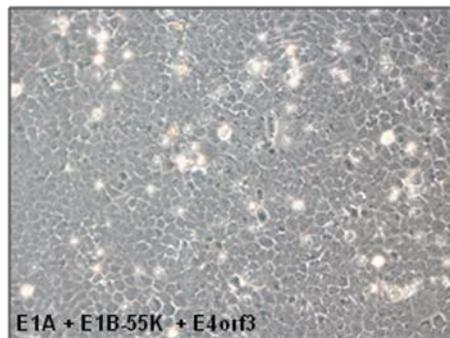
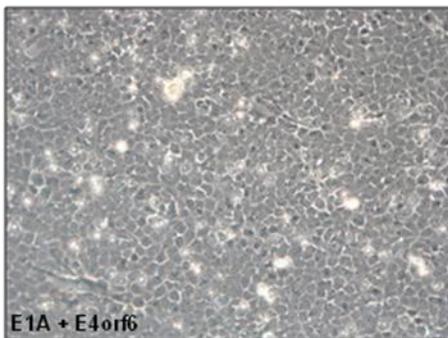
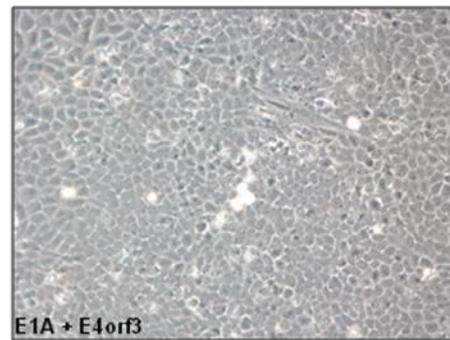
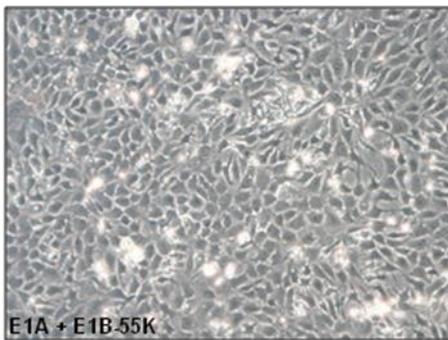
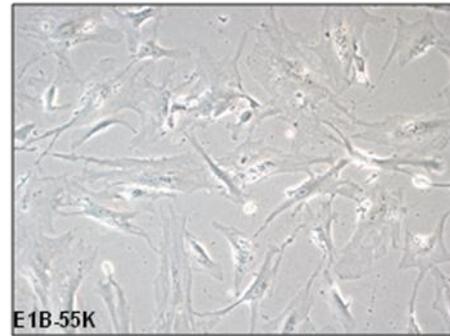
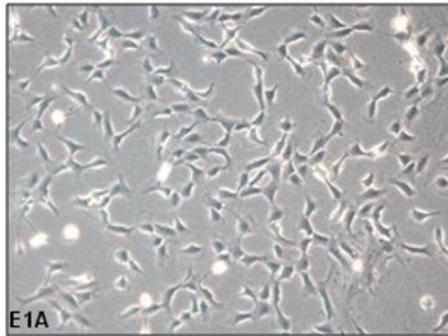
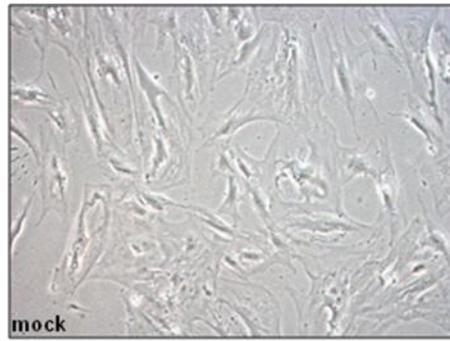
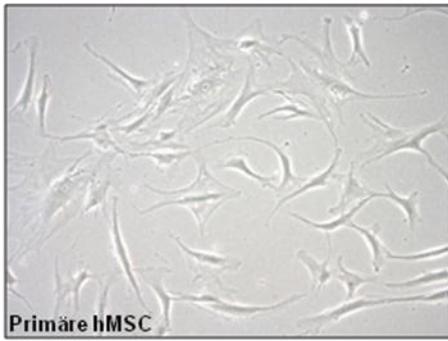
**Abb. 21: Charakterisierung mesenchymaler Stromazellen durch Untersuchung ihres Differenzierungspotenzials**

Mesenchymale Stromazellen sind in der Lage, in Osteoblasten, Adipozyten sowie Chondrozyten zu differenzieren. Mittels spezifischer Stimuli wurde die Differenzierung induziert und durch Färbung nach von Kossa (Osteoblasten), mit Sudan-Rot B (Adipozyten) sowie mit Alcian-Blau (Chondrozyten) nachgewiesen. Vergrößerung x 100.

Abbildung 21 zeigt die in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten differenzierten mesenchymalen Stromazellen. Die Differenzierung wurde mittels spezifischer Stimuli nach etablierten Protokollen induziert. Der Nachweis von Osteoblasten erfolgte anschließend durch von-Kossa-Färbung, Adipozyten wurden durch Färbung mit Sudan-Rot B sichtbar gemacht, und das Vorhandensein von Chondrozyten wurde mittels Alcian-Blau-Färbung nachgewiesen. Insgesamt beweisen diese Ergebnisse, dass es sich bei den in den folgenden Experimenten verwendeten Zellen um multipotente humane mesenchymale Stromazellen handelt.

#### **5.4.2. Die Transduktion der Onkogene E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 führt zur morphologischen Transformation von mesenchymalen Stromazellen**

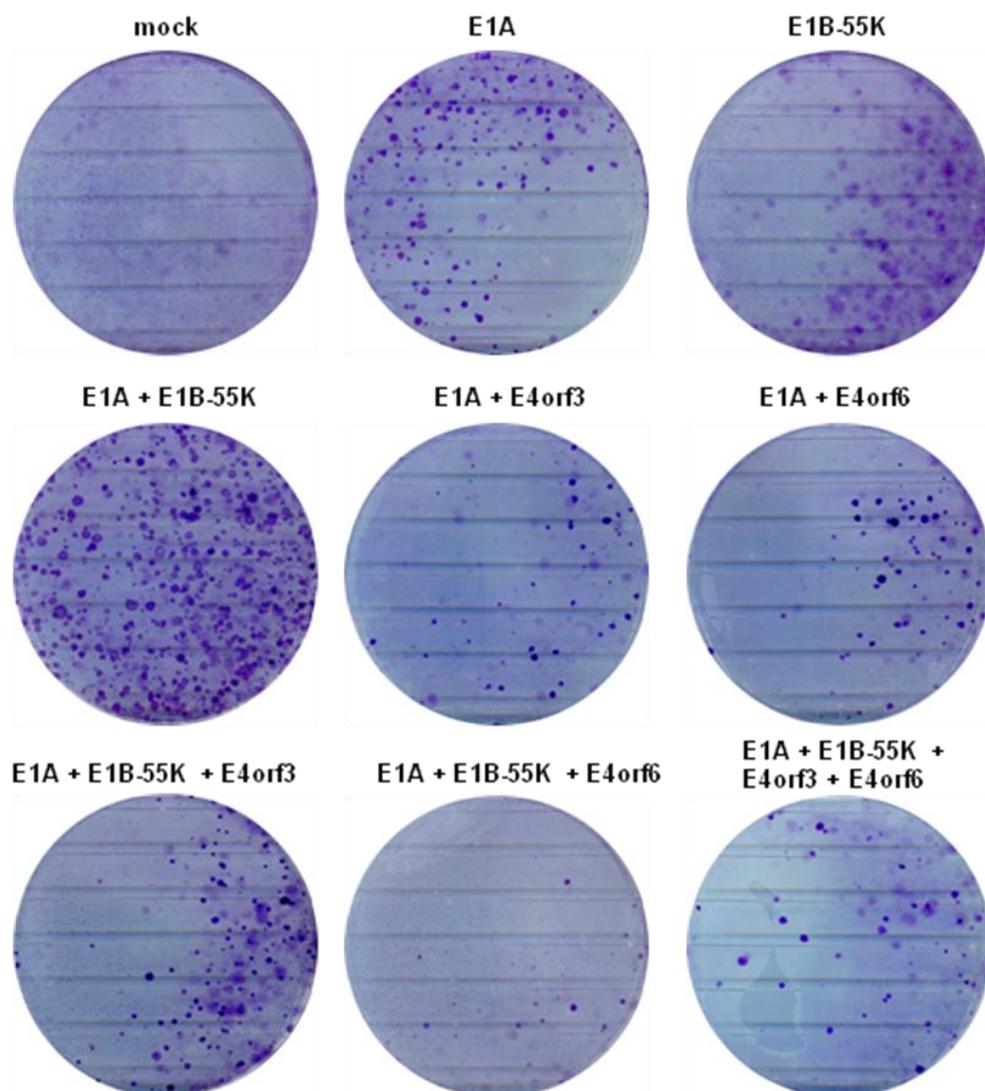
Mittels lentiviraler Transduktion wurden die adenoviralen Onkogene E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 in die kommerziell erworbenen mesenchymalen Stromazellen eingebracht. Dazu wurden in drei voneinander unabhängigen Ansätzen je 100.000 Viruspartikel/150.000 Zellen in den Kombinationen iV2 + iBLB2 (*mock*), iV2-E1A + iBLB2, iV2 + iBLB2-E1B-55K, iV2-E1A + iBLB2-E1B-55K, iV2-E1A + iBLB2-E4orf3, iV2-E1A + iBLB2-E4orf6, iV2-E1A + iBLB2-E1B-55K + iBLB2-E4orf3, iV2-E1A + iBLB2-E1B-55K + iBLB2-E4orf6 sowie iV2-E1A + iBLB2-E1B-55K + iBLB2-E4orf3 + iBLB2-E4orf6 eingesetzt. Nach etwa drei Tagen wurden die so behandelten Kulturen 1:2 auf je zwei größere Kulturgefäße aufgeteilt und bis zur Bildung distinkter *Foci* kultiviert. Je ein Ansatz sollte der Ermittlung der Transformationseffizienz der transduzierten Onkogene dienen, während der zweite Ansatz zur Isolierung von Zellklonen herangezogen werden sollte. Morphologie und Wachstumsverhalten der Zellen wurden mikroskopisch beobachtet (Abbildung 22).



**Abb. 22: Morphologie mesenchymaler Stromazellen nach Transduktion mit adenoviralen Onkogenen**

Mesenchymale Stromazellen wurden lentiviral mit den adenoviralen Onkogenen E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 transduziert. Die mit Onkogenen transduzierten Zellen veränderten im Vergleich zu unbehandelten Zellen und Zellen, die mit den Leervektoren transduziert wurden, deutlich ihre Morphologie. Darüber hinaus bildeten sie dichte Kolonien. Die einzige Ausnahme bildete die Kultur, die nur mit E1B-55K transduziert wurde. Die Lentiviruspartikel wurden in folgenden Kombinationen eingesetzt: iV2 + iBLB2 (*mock*), iV2-E1A + iBLB2, iV2 + iBLB2-E1B-55K, iV2-E1A + iBLB2-E1B-55K, iV2-E1A + iBLB2-E4orf3, iV2-E1A + iBLB2-E4orf6, iV2-E1A + iBLB2-E1B-55K + iBLB2-E4orf3, iV2-E1A + iBLB2-E1B-55K + iBLB2-E4orf6 und iV2-E1A + iBLB2-E1B-55K + iBLB2-E4orf3 + iBLB2-E4orf6. Vergrößerung x 100.

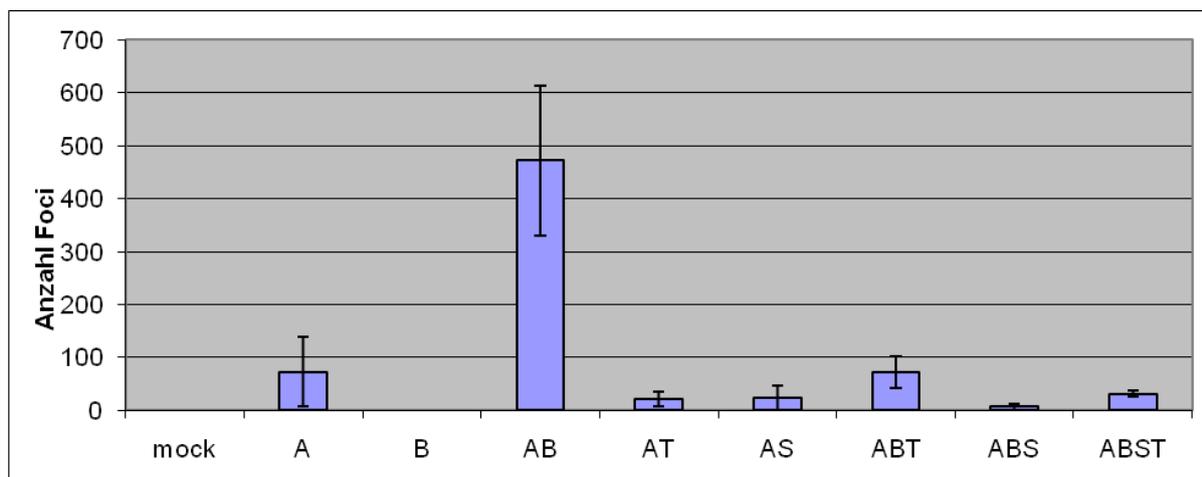
Abbildung 22 zeigt die pflastersteinartig veränderte Morphologie transformierter mesenchymaler Stromazellen. Unbehandelte Zellen sowie Zellen, die mit den Leervektoren iV2 und iBLB2 (*mock*) behandelt wurden, unterschieden sich im Gegensatz dazu deutlich in Form und Größe. Auch die mit E1B-55K behandelte Kultur zeigte keine morphologischen Veränderungen. Ein weiteres Kennzeichen der morphologisch transformierten Zellen war ihre Neigung, dichte Kolonien zu bilden, wie schon aus Vorexperimenten bekannt. Diese konnten nach etwa drei Wochen durch Kristallviolett färbung sichtbar gemacht werden (Abbildung 23).



**Abb. 23: Transformation von mesenchymalen Stromazellen durch adenovirale Onkogene (Kristallviolettgefärbung)**

Mesenchymale Stromazellen wurden lentiviral mit den adenoviralen Onkogenen E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 transduziert. Morphologisch transformierte Zellen wuchsen im Vergleich zu unbehandelten Zellen und mit Leervektoren transduzierten Zellen in dichten Kolonien, die mit Kristallviolett sichtbar gemacht werden konnten. Die Lentiviruspartikel wurden in folgenden Kombinationen eingesetzt: iV2 + iBLB2 (*mock*), iV2-E1A + iBLB2, iV2 + iBLB2-E1B-55K, iV2-E1A + iBLB2-E1B-55K, iV2-E1A + iBLB2-E4orf3, iV2-E1A + iBLB2-E4orf6, iV2-E1A + iBLB2-E1B-55K + iBLB2-E4orf3, iV2-E1A + iBLB2-E1B-55K + iBLB2-E4orf6 und iV2-E1A + iBLB2-E1B-55K + iBLB2-E4orf3 + iBLB2-E4orf6.

In Abbildung 23 ist eines der drei voneinander unabhängigen Transformationsexperimente beispielhaft dargestellt. Die Abbildung zeigt die mit Kristallviolett gefärbten *Foci* morphologisch transformierter Zellen, die besonders zahlreich nach Transduktion von E1A mit E1B-55K auftraten. Die Transduktion aller anderen Kombinationen zog hingegen eine weitaus geringere Koloniebildung nach sich. Die Transduktion von E1B-55K hatte keine Koloniebildung morphologisch transformierter Zellen zur Folge, obwohl die Kultur diesen Eindruck erweckt. Mikroskopische Betrachtung dieser Zellansammlungen zeigte jedoch einen völlig unveränderten Phänotyp der Zellen. Die Kolonien aller drei identischen Ansätze wurden gezählt (Abbildung 24).



**Abb. 24: Transformation mesenchymaler Stromazellen durch adenovirale Onkogene (Anzahl gefärbter *Foci*)**

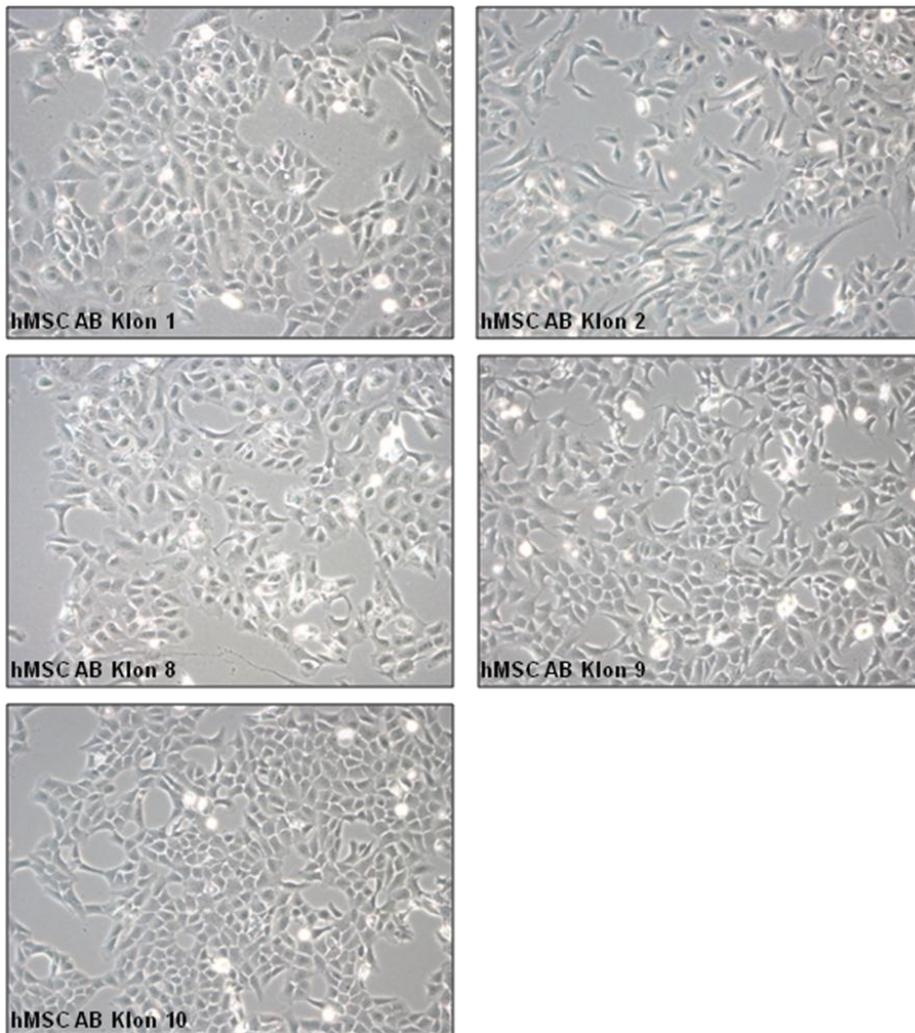
Das Diagramm zeigt Mittelwerte der Koloniezahlen morphologisch transformierter mesenchymaler Stromazellen dreier unabhängiger Ansätze, in denen die Zellen mit den adenoviralen Onkogenen E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 lentiviral transduziert wurden. Die Zählung der *Foci* wurde nach Kristallviolettgefärbung durchgeführt. Die Lentiviruspartikel wurden in folgenden Kombinationen eingesetzt: iV2 + iBLB2 (*mock*), iV2-E1A + iBLB2 (A), iV2 + iBLB2-E1B-55K (B), iV2-E1A + iBLB2-E1B-55K (AB), iV2-E1A + iBLB2-E4orf3 (AT), iV2-E1A + iBLB2-E4orf6 (AS), iV2-E1A + iBLB2-E1B-55K + iBLB2-E4orf3 (ABT), iV2-E1A + iBLB2-E1B-55K + iBLB2-E4orf6 (ABS) und iV2-E1A + iBLB2-E1B-55K + iBLB2-E4orf3 + iBLB2-E4orf6 (ABST).

Abbildung 24 stellt die Mittelwerte der Koloniezahlen mesenchymaler Stromazellen aus drei voneinander unabhängigen Ansätzen dar, die durch Transduktion adenoviraler Onkogene morphologisch transformiert wurden. Die weitaus größte Anzahl wurde durch die

Transduktion von E1A und E1B-55K (AB) erzielt. Damit sind die bereits im Rattensystem erzielten Ergebnisse (5.2.1. und 5.2.2.) zum Teil bestätigt. Geringe Koloniezahlen resultierten aus der Behandlung der Zellen mit E1A (A), was im Transformationsexperiment mit BRK-Zellen ebenfalls genauso beobachtet wurde. Auch die Transduktion von E1A mit E4orf3 (AT) oder mit E4orf6 (AS) zog keine nennenswerte Koloniebildung nach sich, wie bereits in den Ergebnissen unter 5.2.1. und 5.2.2. beschrieben. Während BRK-Zellen nach Behandlung mit E1A, E1B-55K und E4orf6 (ABS) ähnlich starkes Koloniewachstum wie nach Behandlung mit E1A und E1B-55K zeigten, war dieser Effekt im humanen System nicht reproduzierbar. Hier waren lediglich wenige *Foci* zählbar, ebenso wie nach Transduktion von E1A mit E1B-55K und E4orf3 (ABT) sowie von E1A mit E1B-55K und beiden E4-Onkogenen (ABST). Insgesamt bestätigen die hier dargestellten Ergebnisse, dass die Zellspezies der humanen mesenchymalen Stromazellen präferenziell durch adenovirale Onkogene transformierbar sein kann. Außerdem zeigen die Ergebnisse eine mögliche Abhängigkeit des transformierenden Potenzials von Onkogenen der E4-Region auf ihre transiente Anwesenheit in der Wirtszelle, da ihre stabile Expression den Transformationsprozess offenbar hemmt. Hingegen ist die stabile Expression von E1A und E1B-55K in humanen mesenchymalen Stromazellen wie auch in BRK-Zellen dem Transformationsprozess im höchsten Maße zuträglich.

#### **5.4.3. Aus Kulturen transformierter mesenchymaler Stromazellen sind monoklonale AB-Zelllinien isolierbar**

Aus den unter 5.4.2. beschriebenen Kulturen konnten etwa drei bis vier Wochen nach Transduktion der adenoviralen Onkogene *Foci* isoliert und getrennt voneinander weiter kultiviert werden. Dabei zeigten Klone aus den Kulturen, die mit Onkogenen der E4-Region transduziert worden waren, ein deutlich schlechteres Wachstumsverhalten als Klone aus dem mit E1A und E1B-55K behandelten Ansatz. Klone, die aus den mit E4orf6 transduzierten Ansätzen hervorgingen, starben sogar über einen Zeitraum von etwa zwei bis drei Wochen ab. Es gelang jedoch, fünf Klone der mit E1A und E1B-55K (AB) transduzierten Kultur über einen längeren Zeitraum stabil zu kultivieren. Diese Zellklone wurden mit hMSC AB Klon 1, Klon 2, Klon 8, Klon 9 und Klon 10 bezeichnet (Abbildung 25).



**Abb. 25: Morphologie transformierter hMSC-Klone**

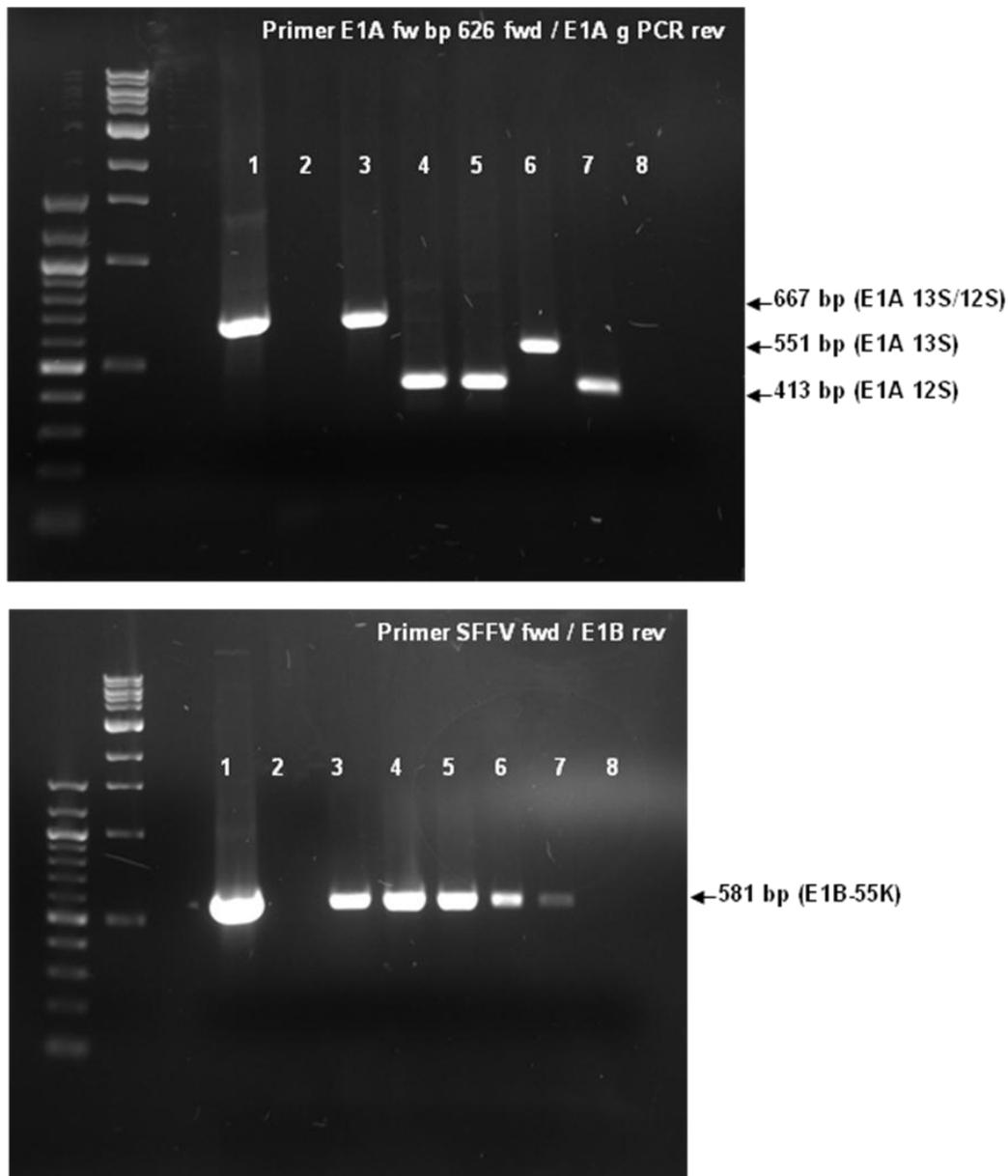
Nach lentiviraler Transduktion mesenchymaler Stromazellen war es möglich, morphologisch transformierte Zellklone zu isolieren und getrennt voneinander zu kultivieren. Für die Transduktion wurden folgende Lentiviruspartikel eingesetzt: iV2-E1A + iBLB2-E1B-55K (AB). Die resultierenden Zellklone wurden mit hMSC AB Klon 1, 2, 8, 9 und 10 bezeichnet. Vergrößerung x 100.

Abbildung 25 zeigt die nahezu identische Morphologie der Kulturen hMSC AB Klon 1, 2, 8, 9 und 10. Auch hier fällt die pflastersteinartige Form der im Vergleich zur Primärkultur deutlich kleineren Zellen auf, wie auch schon im Falle der Amniozyten-Klone beobachtet (5.3.2.). Die lentivirale Transduktion der adenoviralen Onkogene E1A und E1B-55K resultiert demnach in stabil wachsenden Kulturen transformierter humaner mesenchymaler Stromazellen.

**5.4.4. Die transformierten AB-Zellklone exprimieren die transduzierten Onkogene**

Die Kulturen hMSC AB Klon 1, 2, 8, 9 und 10 wurden mittels PCR auf die Integration der transduzierten Onkogene E1A und E1B-55K ins zelluläre Genom analysiert. Darüber hinaus

wurden die Expression dieser Gene im *Western Blot*-Verfahren sowie die subzelluläre Lokalisation der Onkoproteine durch Immunfluoreszenzmarkierung untersucht (Abbildungen 26, 27, 28 und 29).

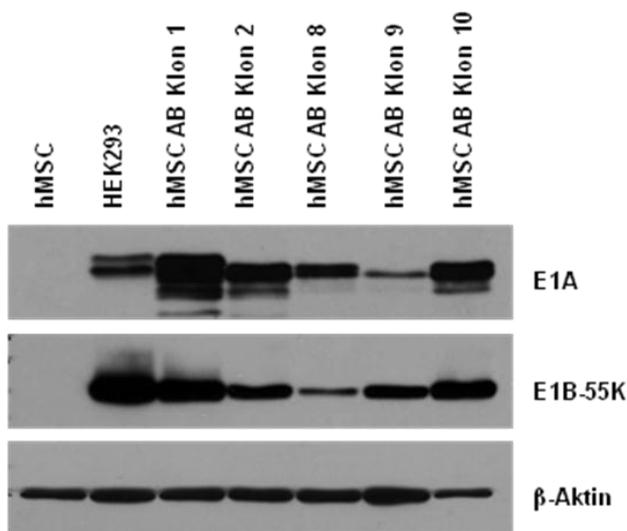


**Abb. 26: Nachweis von E1A- und E1B-55K-Sequenzen**

Genomische DNA wurde aus hMSC-Klonen extrahiert und mittels PCR und Gelelektrophorese auf das Vorhandensein der Sequenzen E1A und E1B-55K untersucht. E1A wurde durch drei unterschiedlich große Fragmente nachgewiesen (667, 551 oder 413 bp), während E1B-55K über ein Fragment mit der Länge von 581 bp zu detektieren war. Als Positivkontrollen dienten die lentiviralen Vektoren iV2-E1A bzw. iBLB2-E1B-55K. Als Negativkontrolle wurde DNA der Primärzellen herangezogen. Je 200 ng DNA wurden in der PCR eingesetzt. Die Proben wurden in folgender Reihenfolge auf das Gel aufgetragen: 1 = Vektor (Positivkontrolle), 2 = primäre hMSC (Negativkontrolle), 3 = hMSC AB Klon 1, 4 = hMSC AB Klon 2, 5 = hMSC AB Klon 8, 6 = hMSC AB Klon 9, 7 = hMSC AB Klon 10, 8 = H<sub>2</sub>O.

Aus hMSC-Klonen extrahierte genomische DNA wurde einer PCR unterzogen, in der spezifische Primer zum Nachweis der Sequenzen E1A und E1B-55K eingesetzt wurden. Die

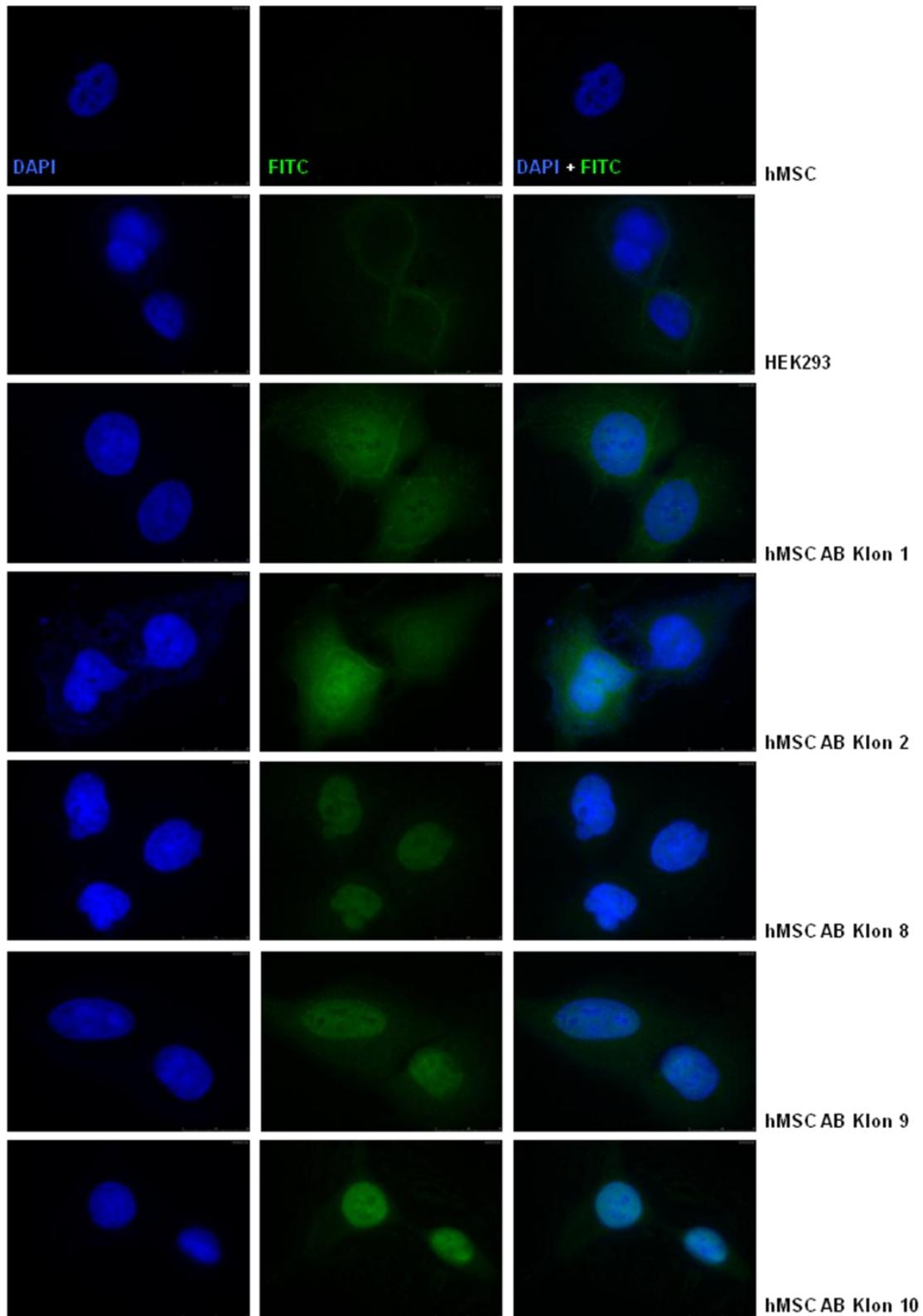
PCR-Produkte wurden in Agarosegelen aufgetrennt, die in Abbildung 26 dargestellt sind. Als Positivkontrollen dienten die Vektoren iV2-E1A bzw. iBLB2-E1B-55K. DNA der Primärzellen wurde als Negativkontrolle verwendet. Der Nachweis der E1A-Sequenz konnte auch in diesem Falle anhand dreier verschiedener DNA-Fragmente erfolgen (667, 551 oder 413 bp). Interessanterweise waren tatsächlich drei verschiedene E1A-Formen in den untersuchten Klonen zu finden, wobei die Spezies 12S überwog. Der Nachweis der Sequenz E1B-55K erfolgte anhand eines 581 bp großen Fragmentes, das ebenfalls im Falle aller fünf Klone detektierbar war.



**Abb. 27: Expression von E1A und E1B-55K**

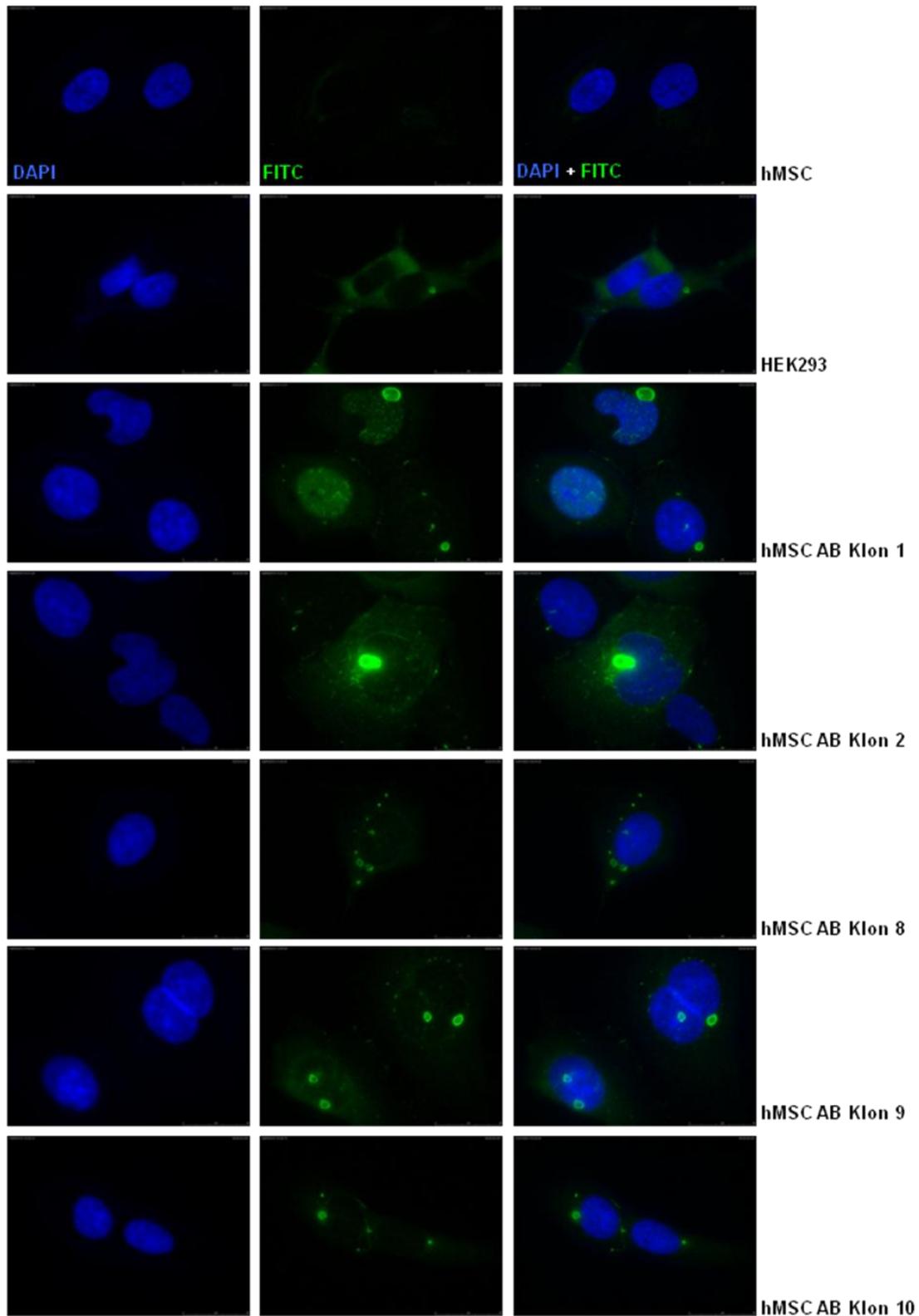
Gesamtzellextrakte der hMSC-Klone wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western Blot*-Verfahren auf die Anwesenheit der Proteine E1A und E1B-55K untersucht. Als Negativkontrolle dienten primäre hMSC. HEK293-Zellen wurden als Positivkontrolle verwendet. Folgende Gesamtproteinmengen wurden auf 12%ige Gele geladen: E1A = 50 µg, E1B-55K = 25 µg, β-Aktin = 10 µg. Für die Detektion wurden die Antikörper anti-E1A (M58), anti-E1B-55K (2A6) und anti-β-Aktin (AC-15) verwendet.

Gesamtzellextrakte der hMSC-Klone wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western Blot*-Verfahren immunologisch auf die Anwesenheit der Proteine E1A und E1B-55K untersucht. Die dabei erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt. Als Negativkontrolle wurde ein Extrakt der unbehandelten Primärzellen verwendet. Ein Extrakt der HEK293-Zellen diente als Positivkontrolle. Durch den für die Detektion von E1A verwendeten Antikörper konnten ebenfalls unterschiedliche E1A-Spezies erkannt werden. E1A-Expression zeigte sich im Falle der HEK293-Zellen wie auch in allen untersuchten Klonen. Ferner konnte die Expression von E1B-55K sowohl in der Positivkontrolle als auch in den fünf hMSC-Klonen detektiert werden. Die Expression von β-Aktin in allen Proben zeigte den Einsatz gleicher Proteinmengen in der Analyse an.



**Abb. 28: Subzelluläre Lokalisation von E1A**

Durch Immunfluoreszenzmarkierung wurde die Lokalisation von E1A in den hMSC-Klonen überprüft. Als Negativkontrolle dienten primäre hMSC. HEK293-Zellen wurden als Positivkontrolle verwendet. Das Chromatin der Zellkerne wurde durch DAPI-Färbung sichtbar gemacht (blauer Kanal, links). Zur Detektion von E1A wurde der Primärantikörper M58 sowie ein FITC-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet (grüner Kanal, Mitte). Zusätzlich ist eine Überlagerung der beiden Kanäle dargestellt (rechts). Vergrößerung x 1000.



**Abb. 29: Subzelluläre Lokalisation von E1B-55K**

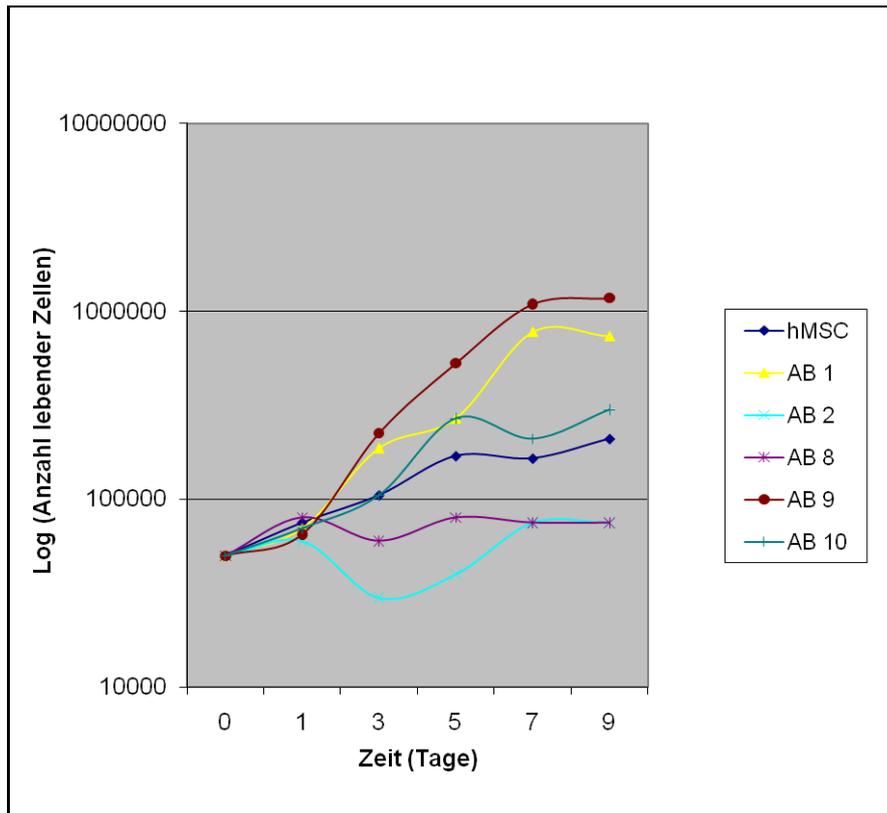
Die Lokalisation von E1B-55K wurde durch Immunfluoreszenzmarkierung in den hMSC-Klonen überprüft. Als Negativkontrolle dienten primäre hMSC, während HEK293-Zellen als Positivkontrolle herangezogen wurden. Mittels DAPI-Färbung wurde das Chromatin der Zellkerne sichtbar gemacht (blauer Kanal, links). E1B-55K wurde mit Hilfe des Primärantikörpers 2A6 sowie durch einen FITC-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen (grüner Kanal, Mitte). Zusätzlich ist eine Überlagerung der beiden Kanäle dargestellt (rechts). Vergrößerung x 1000.

Zur Ermittlung der subzellulären Lokalisation von E1A und E1B-55K wurden diese in hMSC-Klonen durch Immunfluoreszenzmarkierung sichtbar gemacht. Dieses erfolgte im Vergleich zu Primärzellen (Negativkontrolle) sowie zu HEK293-Zellen (Positivkontrolle). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der untersuchten Zellen zeigen die Abbildungen 28 und 29. Im Falle der HEK293-Zellen wie auch bei den Klonen hMSC AB 1 und 2 war das E1A-Protein diffus über die gesamte Zelle verteilt, wobei das Signal in der Positivkontrolle insgesamt deutlich schwächer ausfiel. Interessanterweise war bei den Klonen hMSC AB 8, 9 und 10 E1A vorwiegend auf die Zellkerne konzentriert und nur wenig Protein im Zytoplasma nachzuweisen. Das E1B-55K-Protein war sowohl in der Positivkontrolle als auch in den untersuchten hMSC-Klonen in Form der charakteristischen perinukleären Proteinaggregate unterschiedlicher Größe vorzufinden. Zusätzlich schien es in deutlich kleineren Aggregaten im Zellkern wie auch um die Kernregion herum lokalisiert zu sein. Es gab kaum Unterschiede in der Expressionsstärke von E1B-55K zwischen den einzelnen Klonen und der Positivkontrolle.

Insgesamt zeigen die hier dargestellten Ergebnisse, dass der Phänotyp morphologisch transformierter humaner mesenchymaler Stromazellen nach lentiviraler Transduktion von E1A und E1B-55K mit der stabilen Integration und Expression dieser Onkogene einhergeht.

#### **5.4.5. Die transformierten AB-Zellklone zeigen eine veränderte Wachstumsrate**

hMSC-Klone und Primärzellen wurden darüber hinaus anhand ihrer Wachstumsraten miteinander verglichen. Pro Zelllinie wurden zu diesem Zweck in zwei voneinander unabhängigen Ansätzen je 50.000 Zellen ausgesät und über einen Zeitraum von neun Tagen kultiviert. Die Gesamtzellzahl jeder Kultur wurden an den Tagen 1, 3, 5, 7 und 9 nach Aussaat bestimmt (Abbildung 30).



**Abb. 30: Wachstumsrate von hMSC-Klonen**

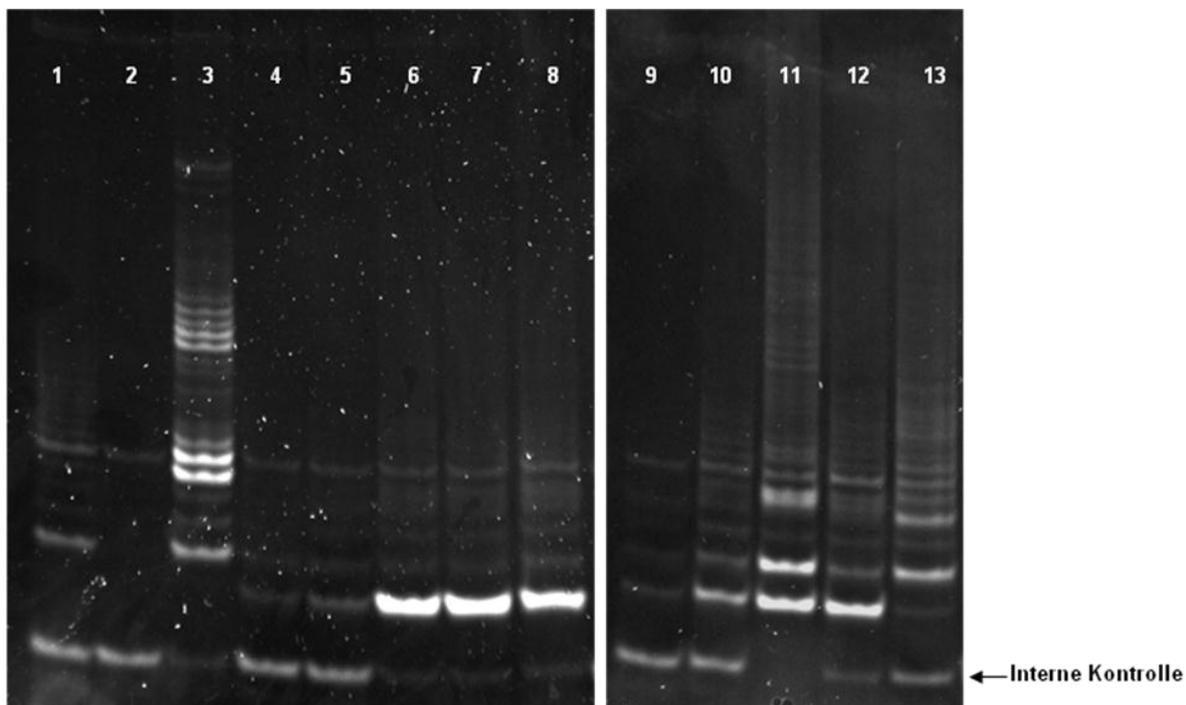
Je 50.000 Zellen der Zelllinien hMSC AB Klon 1, 2, 8, 9 und 10 sowie der Primärzellen wurden ausgesät und über einen Zeitraum von neun Tagen kultiviert. Die Gesamtzahl lebender Zellen jeder Kultur wurde an den Tagen 1, 3, 5, 7 und 9 nach Aussaat mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt. Im oben abgebildeten Diagramm sind die Mittelwerte der einzelnen Zählungen aufgetragen.

Abbildung 30 verdeutlicht, dass alle fünf hMSC-Klone ein im Vergleich zu den Primärzellen verändertes Wachstumsverhalten zeigten. Die Kulturen hMSC AB Klon 1 und 9 vermehrten sich deutlich schneller als die Primärkultur, während hMSC AB Klon 10 eine kaum veränderte Wachstumskinetik aufwies. Ein verlangsamtes Wachstumsverhalten konnte bei den Kulturen hMSC AB Klon 2 und 8 beobachtet werden. Dies weist auf unterschiedliche Charakteristika bezüglich des Proliferationsverhaltens bei den verschiedenen AB-Klonen hin. Die stabile Expression von E1A und E1B-55K in morphologisch transformierten humanen mesenchymalen Stromazellen geht jedoch überwiegend mit einer beschleunigten Zellproliferation einher.

#### 5.4.6. Die transformierten AB-Zellklone zeigen erhöhte Telomeraseaktivität

Die proliferative Kapazität tierischer und menschlicher Zellen hängt direkt mit dem funktionellen Erhalt der Telomerenden ihrer DNA zusammen, die aus TTAGGG-

Wiederholungen bestehen (Collins, 2000). Diese dienen dem Schutz der chromosomalen Enden vor End-zu-End-Fusion, Rekombination und Abbau. In den meisten somatischen Zellen ist die proliferative Kapazität durch den sukzessiven Verlust ihrer Telomersequenzen limitiert (Allsopp *et al.*, 1995; Harley *et al.*, 1990; Martens *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu sind immortale Zellen wie Tumorzellen und embryonale Stammzellen in der Lage, ihre Telomerenden durch die Aktivität der Telomerase zu erhalten (Amit *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 1994). Da der Status humaner mesenchymaler Stromazellen im Hinblick auf ihre Telomeraseaktivität in der Literatur umstritten ist, sollten sowohl ausgewählte hMSC-Klone als auch Primärzellen in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu verschiedenen anderen Zelllinien unter diesem Gesichtspunkt untersucht werden. Dazu wurden Gesamtzellextrakte aller zu untersuchenden Zelllinien einer TRAP-Analyse unterzogen (Abbildung 31).



**Abb. 31: TRAP-Analyse von hMSC-Klonen und Primärzellen**

Mit Hilfe des TRAPEze Telomerase Detection Kit wurden Gesamtzellextrakte der hMSC-Klone und der Primärzellen im Vergleich zu verschiedenen anderen Zelllinien auf Telomeraseaktivität untersucht. Dazu wurden die Extrakte nach Telomerasereaktion einer PCR unterzogen. Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels PAGE aufgetrennt. Telomeraseaktivität zeigt sich anhand eines spezifischen Bandenmusters wie in Spur 1 (Positivkontrolle) sowie in Spur 3 (Quantitätskontrolle). Auf Spur 2 befindet sich eine Negativkontrolle, die kein Zellextrakt enthält. Die erfolgreiche Durchführung der PCR wird jeweils durch die interne Kontrolle angezeigt. Die Proben wurden wie folgt aufgetragen: 4 = hMSC Passage 20 (Lonza), 5 = hMSC Passage 12 (Lonza), 6 = hMSC AB Klon 1, 7 = hMSC AB Klon 9, 8 = hMSC AB Klon 10, 9 = hMSC (UKE), 10 = MRC-5, 11 = HEK293, 12 = HepaRG, 13 = BRK.

Abbildung 31 zeigt das Polyacrylamidgel, in dem Gesamtzellextrakte der Zelllinien hMSC AB Klon 1, 9 und 10 sowie der Primärzellen nach Telomerasereaktion und PCR zur Amplifikation der Telomeraseprodukte aufgetrennt wurden. Als Positivkontrolle diente ein

Zellextrakt, der Bestandteil des TRAPeze Kits ist und aktive Telomerase enthält. Ein Ansatz ohne Zellextrakt wurde als Negativkontrolle verwendet. Darüber hinaus sollte eine im Kit enthaltene Quantitätskontrolle als Maßstab für die Signalstärke dienen. Telomeraseaktivität wurde durch eine Leiter kleiner DNA-Fragmente angezeigt. Gleichmaßen schwache Telomeraseaktivität konnte im Falle der beiden hMSC-Primärzelllysate unterschiedlicher Passagendauer (Lonza) detektiert werden. Die Aktivität zeigte sich hingegen in den untersuchten Zelllinien hMSC AB Klon 1, 9 und 10 deutlich stärker. Auch in einer hMSC-Probe anderen Ursprungs (UKE) konnte ähnlich schwache Telomeraseaktivität wie in den bei der Firma Lonza erworbenen Zellen nachgewiesen werden. Das dargestellte Ergebnis verdeutlicht, dass primäre mesenchymale Stromazellen durchaus Telomeraseaktivität besitzen, wenngleich diese nur schwach ausfällt. Bei den zusätzlich untersuchten Zelllinien (MRC-5, HEK293, HepaRG und BRK) konnte ebenfalls Telomeraseaktivität detektiert werden, wenn auch in Rattenzellen (BRK) mit einem nur schwachen Signal. Besonders zu erwähnen ist jedoch die HEK293-Zelllinie, welche bei dieser Analyse eine sehr starke Aktivität aufwies, ähnlich den in dieser Arbeit generierten hMSC-Klonen. Die stabile Expression von E1A und E1B-55K resultiert möglicherweise nicht nur in einer Verstärkung der Proliferationsgeschwindigkeit (5.4.5.), sondern auch der Telomeraseaktivität.

#### **5.4.7. Die transformierten AB-Zellklone zeigen kein tumorigenes Potenzial in Nacktmäusen**

Frühere Arbeiten zeigen, dass BRK-Zellen, die durch Transfektion adenoviraler Onkogene sowohl bezüglich ihrer Morphologie als auch ihres Wachstumsverhaltens transformiert werden konnten, zusätzlich tumorigenes Potenzial in immundefizienten Nacktmäusen besitzen. Hoch tumorigen sind dabei insbesondere ABS- und ABST-Zellen, also Zellen, die mit E1A, E1B-55K und E4orf6 bzw. E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 behandelt wurden (Nevels *et al.*, 2000; Nevels *et al.*, 1999a; Nevels *et al.*, 1999b). Um festzustellen, ob es sich bei den an den hMSC-Klonen beobachteten Veränderungen in Morphologie und Wachstumsverhalten um eine onkogene Transformation handelt, sollten diese Zellen ebenfalls hinsichtlich ihres tumorigenen Potenzials in Nacktmäusen analysiert werden. Dazu wurden die Zelllinien hMSC AB Klon 9 und 10 sowie ein Pool der Kultur untersucht, aus dem diese Klone isoliert worden waren. Als Negativkontrolle dienten die Primärzellen. Die hoch tumorigene BRK-Zelllinie ABS1 (Nevels *et al.*, 2000) wurde als Positivkontrolle verwendet. Die Zelllinien wurden den Tieren subkutan injiziert. Anschließend wurden die Mäuse über

einen Zeitraum von zehn Wochen hinsichtlich ihres Körpergewichtes und sichtbarer Tumorbildung überwacht. Lediglich die Positivkontrolle ABS1 induzierte in diesem Experiment eine deutliche Tumorbildung. Der AB-Zellpool und die beiden hMSC-Klone (hMSC AB Klon 9 und 10) verursachten kein Tumorwachstum. Das Ergebnis dieses Experimentes zeigt, dass die morphologische Transformation der untersuchten hMSC-Klone nicht mit einem tumorigenen Potenzial dieser Zellen einhergeht.

#### 5.4.8. Die transformierten AB-Zellklone zeigen einen veränderten Chromosomenstatus

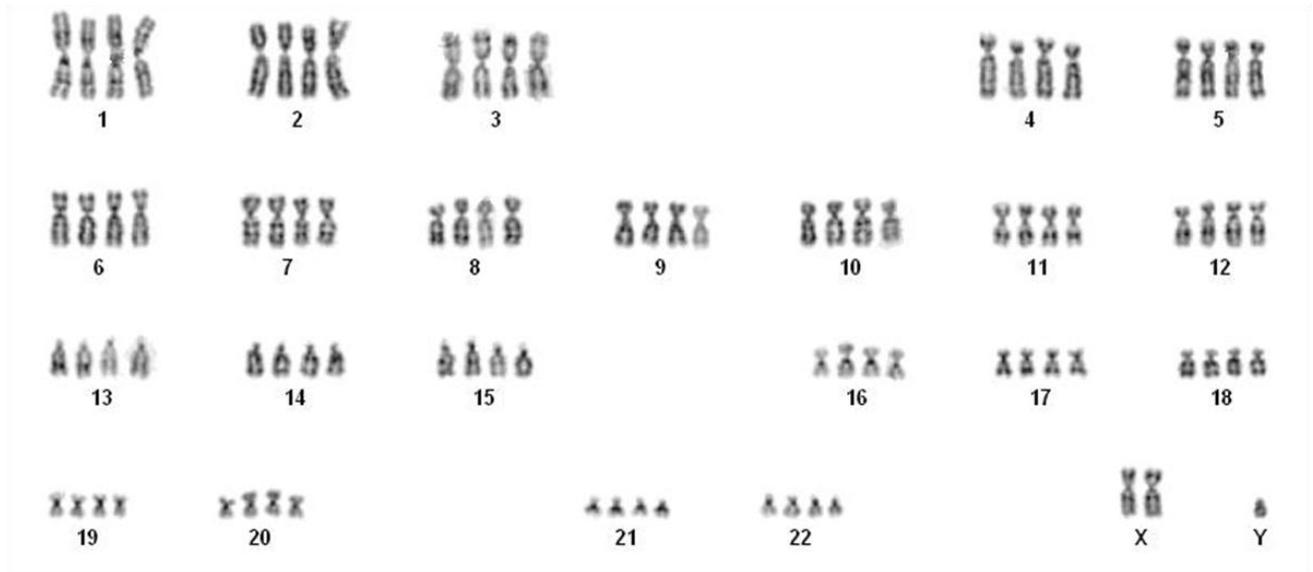
Da transformierte Zellen bzw. Tumorzellen häufig durch komplexe chromosomale Veränderungen charakterisiert sind, sollten auch ausgewählte hMSC-Klone (hMSC AB Klon 1, 9 und 10) bezüglich ihres chromosomalen Status untersucht werden (Abbildungen 33 und 34). Zuvor wurde zu Vergleichszwecken ein Karyogramm der Primärzellen erstellt (Abbildung 32).



**Abb. 32: Karyogramm primärer humaner mesenchymaler Stromazellen**

Die bei der Firma Lonza erworbenen humanen mesenchymalen Stromazellen wurden hinsichtlich ihres Karyotyps untersucht. Es handelt sich um Zellen eines männlichen Spenders mit einem diploiden Chromosomensatz (diese Untersuchung wurde von der Firma MVZ genteQ in Hamburg durchgeführt).

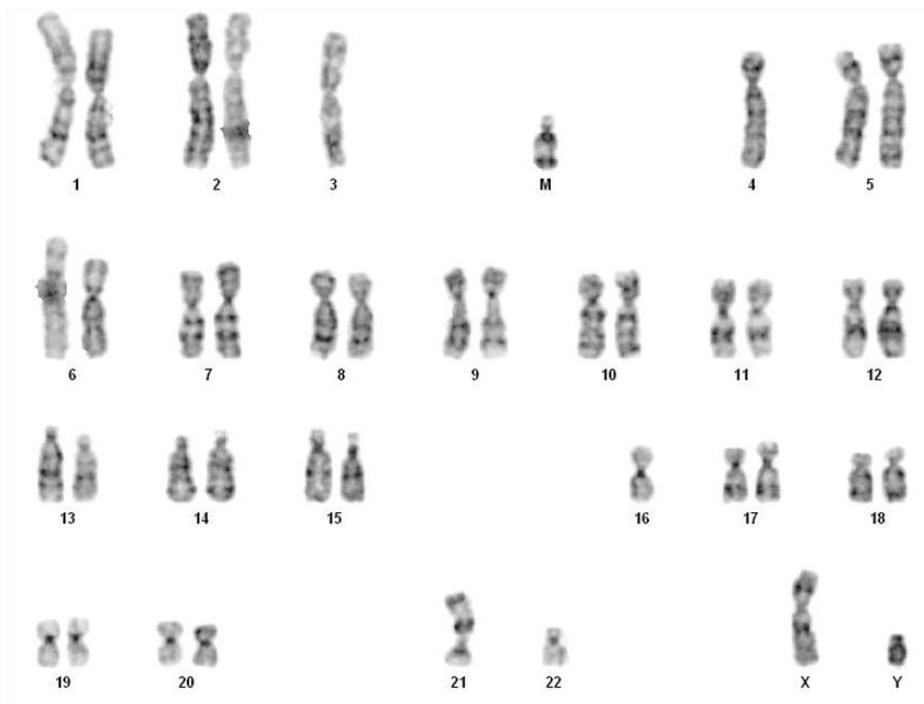
In Abbildung 32 ist das Karyogramm der primären mesenchymalen Stromazellen dargestellt. Es handelt sich um einen normalen (diploiden) Chromosomensatz eines Spenders männlichen Geschlechts.



**Abb. 33: Karyogramm von hMSC AB Klon 10**

Die hMSC Klone AB 1, 9 und 10 wurden im Vergleich zu den primären mesenchymalen Stromazellen hinsichtlich chromosomaler Veränderungen untersucht. Die Abbildung zeigt einen tetraploiden Chromosomensatz des hMSC AB Klon 10 (diese Untersuchung wurde von der Firma labdia Labordiagnostik in Wien durchgeführt).

Zur Ermittlung des Karyotyps von hMSC Klon 9 wurden 18 Metaphasenpräparate analysiert. Dabei zeigten neun Präparate einen unauffälligen männlichen Karyotyp, der dem der Primärzellen entsprach. In fünf Metaphasenpräparaten wurde jedoch ein tetraploider Chromosomensatz ohne weitere Chromosomenaberrationen nachgewiesen. Vier weitere Präparate zeigten unterschiedliche, nicht klonale Karyotypanomalien. Zur zytogenetischen Analyse von hMSC AB Klon 10 wurden 22 Metaphasenpräparate untersucht. Von diesen zeigten 20 Präparate einen unauffälligen männlichen Chromosomensatz, während in zwei Metaphasenpräparaten tetraploide Chromosomensätze ohne weitere Chromosomenanomalien vorlagen. Beispielhaft ist der tetraploide Chromosomensatz eines Präparats des hMSC AB Klon 10 in Abbildung 33 dargestellt.



**Abb. 34: Karyogramm von hMSC AB Klon 1**

Die hMSC Klone AB 1, 9 und 10 wurden im Vergleich zu den primären mesenchymalen Stromazellen hinsichtlich chromosomaler Veränderungen untersucht. Die Abbildung zeigt den Karyotyp von hMSC AB Klon 1, der komplexe chromosomale Aberrationen in Form von Deletionen (Chromosom 3, 4, 16, 21 und 22) sowie ein zusätzliches Markerchromosom (M) aufweist (diese Untersuchung wurde von der Firma labdia Labordiagnostik in Wien durchgeführt).

Die zytogenetische Untersuchung von hMSC Klon 1 wurde aufgrund von 20 Metaphasenpräparaten durchgeführt. Hierbei zeigten sich im Falle aller analysierten Präparate sehr ähnliche chromosomale Anomalien. Diese zeichneten sich durch mehrere Deletionen ganzer Chromosomen sowie die Anwesenheit eines zusätzlichen Markerchromosoms aus, das vermutlich Bruchstücke der deletierten Chromosomen enthielt. Die Chromosomen 4 und 21 fehlten in allen Präparaten, während sich einige Präparate auch durch das zusätzliche Fehlen der Chromosomen 3, 8, 16 und/oder 22 auszeichneten. Ein aus dieser Analyse resultierendes Karyogramm ist beispielhaft in Abbildung 34 dargestellt. Die Ergebnisse der zytogenetischen Untersuchungen verdeutlichen, dass die morphologische Transformation mesenchymaler Stromazellen mit komplexen chromosomalen Veränderungen einhergehen kann. Im Falle der Zelllinien hMSC AB Klon 9 und 10 waren diese allerdings nur in einer geringen Zahl der untersuchten Zellen nachzuweisen, während die Anomalien im Falle von Klon 1 klonal vorlagen.

## 6. DISKUSSION

### 6.1. Transformationspotenzial und Onkogenität humaner Adenoviren

Nach heutigem Wissensstand sind verschiedene Viren mit einer Reihe maligner Krankheitsbilder beim Menschen assoziiert (Cathomas *et al.*, 1996; Farrell *et al.*, 1997; Gissmann *et al.*, 1982; Parkin, 2006; Poiesz *et al.*, 1980; Szmuness, 1978). Neben bekannten Beispielen wie den humanen Papillomviren, Hepatitisviren oder Herpesviren sind in diesem Zusammenhang auch immer wieder die humanen Adenoviren in die Diskussion gebracht worden. Grundlage dafür bilden insbesondere Arbeiten wie von Kuwano sowie von Kosulin und Kollegen, in denen ein möglicher Zusammenhang zwischen kleinzelligen Lungenkarzinomen bzw. kindlichen Hirntumoren mit Adenovirusinfektionen dargelegt wird (Kosulin *et al.*, 2007; Kuwano *et al.*, 1997). Ein Beweis für eine direkte Korrelation zwischen einer Adenovirusinfektion und nachfolgender Tumorentstehung beim Menschen konnte jedoch bislang nicht erbracht werden. Im Gegensatz dazu ist die Tumorigenität humaner Adenoviren im Tiermodell bereits seit Jahrzehnten gut belegt (Graham, 1984; Modrow and Falke, 2002; Nevins and Vogt, 2007; Trentin *et al.*, 1962). Grundlage für das tumorigene Potenzial humaner Adenoviren ist die Transformation von Zellen durch die Expression viraler Onkogene, die zum Zwecke einer effizienten Virusvermehrung Einfluss auf Zellzyklusprogression, Apoptose- und Seneszenzmechanismen sowie DNA-Reparatur der Wirtszelle nehmen. In den meisten adenoviral induzierten Tumoren und transformierten Zelllinien persistiert die virale DNA in den Zellen, so dass onkogene Virusproteine stabil exprimiert werden, was dem klassischen Modell der viralen Onkogenese entspricht (Graham, 1984). Anderen Beobachtungen zufolge scheint die ständige Präsenz adenoviraler Onkogene nicht zwangsläufig für die Aufrechterhaltung eines onkogenen Phänotyps von Zellen erforderlich zu sein, was wiederum auf einen Transformationsmechanismus nach dem „Hit & Run“-Prinzip hinweist (Kuhlmann *et al.*, 1982; Nevels *et al.*, 2001; Paraskeva *et al.*, 1982; Paraskeva and Gallimore, 1980; Pfeffer *et al.*, 1999).

Die *in vitro*-Transformation von primären Nagerzellen durch adenovirale Onkogene war bereits Gegenstand zahlreicher Arbeiten (Nevins and Vogt, 2007), wodurch insbesondere die Funktionen von E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 im Transformationsprozess aufgeklärt werden konnten. So ist das Onkoprotein E1A in der Lage, Zellen zu immortalisieren oder

partiell zu transformieren, wobei die alleinige Transformation durch E1A ineffizient und unvollständig ist. Erst unter dem zusätzlichen Einfluss von E1B-55K kommt es zur Vervollständigung eines transformierten Phänotyps der Zellen (Graham, 1984; Shenk, 2001). Darüber hinaus scheinen auch die Onkoproteine E4orf3 und E4orf6 die Zelltransformation zu verstärken (Moore *et al.*, 1996; Nevels *et al.*, 1997; Nevels *et al.*, 1999a; Nevels *et al.*, 1999b). Besonders gut wurde in diesem Zusammenhang das Transformationspotenzial der Onkogene von HAdV5 untersucht. Im Gegensatz zu Transformationsexperimenten an Nagerzellen wird bisher nur in wenigen Arbeiten von einer erfolgreichen *in vitro*-Transformation primärer humaner Zellen berichtet (Fallaux *et al.*, 1996; Graham *et al.*, 1977; Schiedner *et al.*, 2000). Auch in diesem Zusammenhang wurde der Fokus auf die Untersuchung der transformierenden Eigenschaften von HAdV5 gerichtet.

In Transformationsexperimenten früherer Studien wurden die zu untersuchenden adenoviralen Onkogene hauptsächlich in Form von Plasmiden transfiziert. Diese Methode resultiert überwiegend in einer transienten Anwesenheit der transferierten DNA in den Zielzellen und kann zudem ineffizient sein; indem in der Regel nur ein Teil der behandelten Zellen die DNA aufnimmt. Der Gentransfer mit Hilfe eines lentiviralen Vektorsystems zur Transduktion der adenoviralen Onkogene E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 (HAdV5) stellte somit in der vorliegenden Arbeit eine überaus interessante Alternative zur herkömmlichen Methodik in Transformationsexperimenten an primären Rattenzellen und menschlichen Zellen dar, da hiermit stabile Anwesenheit und Expression der transduzierten Gene erreicht wird. Zudem kann durch den Einsatz entsprechend hoher Zahlen von Lentiviruspartikeln ein Großteil der behandelten Zellen transduziert werden.

## **6.2. Die lentivirale Transduktion adenoviraler Onkogene ist eine funktionale und hoch effiziente Methode zur *in vitro*-Transformation von Säugerzellen**

In klassischen Experimenten zu den transformierenden Eigenschaften der adenoviralen Onkogene E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 führt ihre Transfektion zu morphologischen Veränderungen der behandelten Zellen, was mit der Bildung distinkter Kolonien einhergeht (Nevels *et al.*, 2000; Nevels *et al.*, 1999a; Nevels *et al.*, 1999b; Nevels *et al.*, 2001; Schiedner *et al.*, 2000; Wimmer *et al.*, 2010). Dabei werden in der Literatur beispielsweise absolute Koloniezahlen von ca. 20 beschrieben, die aus der Transfektion von E1A und E1B-55K resultierten (Nevels *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu wurden die Transformationsexperimente

an Nierenzellen neugeborener Ratten, humanen Amniozyten und humanen mesenchymalen Stromazellen in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des lentiviralen Vektorsystems LeGO durchgeführt (Weber *et al.*, 2008), in dem die Onkogene E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 individuell kodiert waren. In Kulturen mesenchymaler Stromazellen, die mit Hilfe der in Lentiviruspartikel verpackten Onkogene E1A und E1B-55K transduziert wurden, konnten nach dieser Behandlung bis zu 450 Kolonien morphologisch transformierter Zellen gezählt werden (5.4.2.). Die Transduktion anderer Onkogenkombinationen zog zwar eine weniger zahlreiche Koloniebildung nach sich, dennoch waren diese Zahlen in Relation zu Ergebnissen aus früheren Arbeiten, die mit der Transfektion derselben Onkogene erreicht wurden, deutlich höher (5.2.1., 5.2.2., 5.4.2.). Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass es sich bei dem in dieser Arbeit etablierten System lentiviraler Vektoren zum Zwecke der Zelltransformation um ein funktionales Mittel zum Gentransfer adenoviraler Onkogene in BRK-Zellen, humane Amniozyten und humane mesenchymale Stromazellen handelt. Außerdem zeichnet sich diese Methode durch die Erzielung einer überaus hohen Transformationseffizienz in den damit behandelten Zellen aus.

### **6.3. Die gemeinsame stabile Expression von E1A und E1B-55K ist Voraussetzung für eine effiziente *in vitro*-Transformation von Säugerzellen**

Das Transformationspotenzial des Onkoproteins E1A beruht auf seiner Eigenschaft, durch Blockierung von pRb den Eintritt ruhender Zellen in die S-Phase zu stimulieren und somit den Zellzyklus anzutreiben, wodurch außerplanmäßige DNA-Synthese und Zellproliferation bedingt werden (Berk, 2005; Dyson and Harlow, 1992; Endter and Dobner, 2004). Durch seine Eigenschaft, den Tumorsuppressor p53 zu stabilisieren, übt E1A allerdings gleichermaßen einen antiproliferativen Einfluss aus (Sabbatini *et al.*, 1995; White, 1995). Das Onkoprotein E1B-55K wirkt diesem Effekt jedoch entgegen, indem es p53 auf verschiedenen Wegen inaktiviert (Blair Zajdel and Blair, 1988; Harada *et al.*, 2002; Kao *et al.*, 1990; Shen *et al.*, 2001; Yew and Berk, 1992; Yew *et al.*, 1994; Zantema *et al.*, 1985). Damit vervollständigt E1B-55K den Transformationsprozess. Dem klassischen Modell viraler Onkogenese entsprechend konnte man in verschiedenen früheren Studien zeigen, dass die Onkogene E1A und E1B-55K stabil in transformierten Zellen exprimiert werden (Graham *et al.*, 1977; Hutton *et al.*, 2000; Zantema *et al.*, 1985). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen diesen Sachverhalt nochmals. Da durch die Verwendung lentiviraler Vektoren in der Regel stabile Integration der so transferierten DNA in das Genom der Zielzellen

erreicht wird, war dadurch in den experimentellen Ansätzen dieser Arbeit auch stabile Expression der transduzierten Onkogene zu erwarten. In allen Transformationsexperimenten an Rattenzellen und menschlichen Zellen wurden in Folge der lentiviralen Transduktion von E1A und E1B-55K tatsächlich auffällig hohe Transformationsraten erzielt, wie anhand der mit Kristallviolett gefärbten Kolonien morphologisch transformierter Zellen festgestellt werden konnte (5.2.1., 5.2.2., 5.4.2.). Außerdem waren die Koloniezahlen, die aus der Transduktion dieser beiden Onkogene resultierten, in allen durchgeführten Experimenten deutlich höher als die Zahlen, die durch die alleinige Transduktion von E1A erreicht wurden, während die alleinige Transduktion von E1B-55K kein Koloniewachstum nach sich zog (5.2.1., 5.2.2., 5.4.2.). Auch diese Beobachtung unterstreicht die in der Literatur beschriebenen Erkenntnisse, nach denen hohes Transformationspotenzial nur aus dem Zusammenspiel von E1A und E1B-55K resultiert (Graham, 1984; Shenk, 2001).

#### **6.4. Das transformationsverstärkende Potenzial von E4orf3 und E4orf6 in Säugerzellen scheint auf ihrer transienten Anwesenheit zu beruhen**

Die transformationsfördernden Eigenschaften von E4orf3 und E4orf6 wird auf ihren Einfluss auf verschiedene Komponenten der DNA-Reparatur wie die DNA-PK und Mre11 zurückgeführt (Araujo *et al.*, 2005; Boyer *et al.*, 1999; Evans and Hearing, 2005; Mohammadi *et al.*, 2004; Nicolas *et al.*, 2000; Stracker *et al.*, 2002; Stracker *et al.*, 2005; Weiden and Ginsberg, 1994). E4orf6 wird zusätzlich mit dem Abbau von p53 assoziiert (Cathomen and Weitzman, 2000; Querido *et al.*, 2001; Steegenga *et al.*, 1998; Wienzek *et al.*, 2000), während eine individuelle Funktion von E4orf3 die Reorganisation der PML *nuclear bodies* ist (Carvalho *et al.*, 1995; Puvion-Dutilleul *et al.*, 1995). Daten aus früheren Studien zufolge sind die Onkogene E4orf3 und E4orf6 im Gegensatz zu E1A und E1B-55K jedoch nicht in damit behandelten transformierten Zellen nachzuweisen, was auf einen Transformationsmechanismus nach dem „*Hit & Run*“-Prinzip der viralen Onkogenese hinweist (Nevels *et al.*, 2001). Auch die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse deuten auf eine Abhängigkeit des Transformationspotenzials dieser Onkogene auf ihre transiente Anwesenheit in den Zellen hin und könnten somit ebenfalls für einen Transformationsmechanismus nach dem „*Hit & Run*“-Modell sprechen. So resultierte die Transduktion von E4orf3 und E4orf6 in unterschiedlicher Kombination mit anderen Onkogenen insbesondere in Transformationsexperimenten an mesenchymalen Stromazellen in vergleichsweise geringen Transformationsraten (5.4.2.). In diesen Zellen stand die durch

lentivirale Transduktion erreichte stabile Expression der E4-Onkogene dem Transformationsprozess demnach offenbar entgegen. In BRK-Zellen wurden in vergleichbaren experimentellen Ansätzen allerdings teilweise höhere Transformationsraten erzielt, vor allem durch die Transduktion von E1A mit E1B-55K und E4orf6 (5.2.1., 5.2.2.). Möglicherweise resultiert die stabile Expression von E4-Onkogenen in einem zytotoxischen Effekt, der den Transformationsprozess hemmt. Dieses Phänomen scheint vor allem auf humane Zellen zuzutreffen und in Nagerzellen weniger stark ausgeprägt zu sein. Die Gründe hierfür sind allerdings unbekannt und werden in weiterführenden Arbeiten zu klären sein. Denkbar ist jedoch beispielsweise, dass der Abbau zellulärer Substrate durch den aus E1B-55K, E4orf6 und zellulären Faktoren gebildeten E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex (2.3.3.1.) einen zytotoxischen Effekt bedingen könnte. Studien von Cheng sowie von Forrester und Kollegen zeigten bei der Untersuchung der Substratspezifität dieses Komplexes in menschlichen Zellen, dass dieser bei allen untersuchten Spezies humaner Adenoviren vor allem den Abbau der DNA-Ligase IV bedingt, während andere Substrate wie p53 oder Mre11 nicht im Falle jeder Spezies dem Abbau zugeführt werden (Cheng *et al.*, 2011; Forrester *et al.*, 2011). Die DNA-Ligase IV spielt eine entscheidende Rolle in der DNA-Reparatur (Christmann *et al.*, 2003). Das Fehlen dieser Ligase kann möglicherweise von menschlichen Zellen nicht kompensiert werden. Es wäre zu klären, ob neben den Abweichungen in der Substratspezifität des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes bei verschiedenen Spezies humaner Adenoviren zusätzlich Variationen bei Mensch und Nager bestehen. Sollte dieses zutreffen, wären damit die Unterschiede in der Transformationseffizienz unter dem Einfluss von E4orf6 in Rattenzellen und menschlichen Zellen erklärbar.

#### **6.5. Die stabile Expression von E1A und E1B-55K in Amniozyten und mesenchymalen Stromazellen resultiert in stabil wachsenden Kulturen morphologisch transformierter Zellklone**

Die bisher in der Literatur nur sehr selten beschriebene *in vitro*-Transformation humaner Zellen durch adenovirale Onkogene wurde anhand der lentiviralen Transformationsexperimente an Amniozyten und mesenchymalen Stromazellen in der vorliegenden Arbeit mit Erfolg erzielt. Zunächst zeigten sich Amniozyten durch die Onkogene E1A und E1B-55K transformierbar. Sowohl morphologische Veränderungen und Koloniebildung als auch teilweise beschleunigte Zellproliferation konnten anhand dieser Zellen beobachtet werden. Darüber hinaus war es möglich, monoklonal isolierte Kolonien

getrennt voneinander zu kultivieren und die Integration und Expression beider Onkogene in diesen Zellen nachzuweisen (5.3.1., 5.3.2., 5.3.3.). Weil humanes Fruchtwasser eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen enthält (Bossolasco *et al.*, 2006; Gosden, 1983; Hoehn and Salk, 1982; Prusa and Hengstschlager, 2002), stellte sich die Frage, ob eine oder mehrere Zellspezies präferenziell durch adenovirale Onkogene transformierbar sind. Da die Amniozytenpopulation unter anderem aus mesenchymalen Stromazellen besteht, eine Zellspezies, aus der Sarkome hervorgehen können (Helman and Meltzer, 2003; In 't Anker *et al.*, 2003; Kaviani *et al.*, 2003; Nombela-Arrieta *et al.*, 2011), die in Nagern neben anderen Tumoren durch humane Adenoviren induzierbar sind (Graham, 1984), wurden Zellen unter Bedingungen aus der Mischpopulation isoliert, die für mesenchymale Stromazellen spezifisch sind (5.3.4.). Sowohl die daraus resultierende Zellpopulation als auch kommerziell erworbene mesenchymale Stromazellen zeigten sich tatsächlich in hoch effizienter Weise durch adenovirale Onkogene transformierbar. Auch in diesem Falle war es möglich, einzelne Kolonien morphologisch transformierter Zellen zu isolieren und zu kultivieren, die zuvor mit E1A und E1B-55K transduziert worden waren. Alle daraus resultierenden Zelllinien zeigten stabile Integration und Expression der transduzierten Onkogene sowie teilweise eine beschleunigte Proliferationsgeschwindigkeit (5.3.5., 5.4.2., 5.4.3., 5.4.4.; 5.4.5.). Diese Ergebnisse bestätigen die Transformierbarkeit humaner Zellen embryonalen Ursprungs durch adenovirale Onkogene, wie auch schon durch Graham, Fallaux und Schiedner gezeigt (Fallaux *et al.*, 1996; Graham *et al.*, 1977; Schiedner *et al.*, 2000). Erstmals konnten in der vorliegenden Arbeit jedoch auch multipotente mesenchymale Stromazellen des adulten Knochenmarks adenoviral transformiert werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Zellspezies präferenziell durch adenovirale Onkogene transformierbar sein kann. In weiterführenden Arbeiten wäre zu überprüfen, ob sich auch andere multipotente Progenitorzellen durch die Expression adenoviraler Onkogene transformierbar zeigen und ob Progenitorzellen demnach eine Zellspezies darstellen, die generell präferenziell durch Onkogene humaner Adenoviren transformierbar ist.

## **6.6. Die morphologische Transformation von mesenchymalen Stromazellen durch E1A und E1B-55K geht mit erhöhter Telomeraseaktivität einher**

Kennzeichen immortaler Zellen wie beispielsweise embryonaler Zellen oder Tumorzellen ist die Aktivität der Telomerase, die die Telomerenden ihrer DNA erhält und damit die proliferative Kapazität dieser Zellen sicherstellt (Amit *et al.*, 2000; Collins, 2000; Kim *et al.*,

1994). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch primäre mesenchymale Stromazellen schwache Telomeraseaktivität besitzen, ein Sachverhalt, der in der Literatur bislang umstritten ist (5.4.6.). So wird unter anderem postuliert, dass Telomeraseaktivität nicht in mesenchymalen Stromazellen detektierbar ist (Zimmermann *et al.*, 2003), während eine andere Gruppe zeigen konnte, dass diese durchaus vorhanden ist, aber im Verlauf der Zellalterung abnimmt (Guillot *et al.*, 2007). Ein überaus interessantes Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist jedoch vor allem die Beobachtung, dass sich die schwach ausgeprägte Telomeraseaktivität der primären mesenchymalen Stromazellen in den durch E1A und E1B-55K transformierten Klonen deutlich erhöht zeigte (5.4.6.). Dieses dürfte möglicherweise mit der zusätzlich beobachteten Beschleunigung des Zellwachstums einiger Klone einhergehen (5.4.5.). Maligne Transformation somatischer Zellen wird bereits seit einiger Zeit mit der Aktivierung der Telomerase und dem Telomererhalt in Zusammenhang gebracht. Der zentrale Mechanismus scheint in diesem Zusammenhang die transkriptionelle Kontrolle des hTERT-Gens (hTERT = *human telomerase reverse transcriptase*) zu sein, das für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodiert (Horikawa and Barrett, 2003). So ist beispielsweise der Tumorsuppressor p53 in der Lage, die hTERT-Transkription zu reprimieren (Xu *et al.*, 2000). Dass p53 auf verschiedenen Wegen durch das Onkoprotein E1B-55K inhibiert wird, könnte die erhöhte Telomeraseaktivität in den transformierten Zellklonen erklären. Tatsächlich ist auch von Onkoproteinen anderer Viren, beispielsweise vom E6-Protein des hoch onkogenen HPV Typ 16 bekannt, Telomeraseaktivität in somatischen Zellen zu induzieren (Klingelutz *et al.*, 1996). Somit ist auch ein direkter Zusammenhang zwischen transformiertem Phänotyp und erhöhter Telomeraseaktivität der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Zellklone durch die stabile Expression adenoviraler Onkogene naheliegend.

### **6.7. Durch E1A und E1B-55K morphologisch transformierte mesenchymale Stromazellen zeigen chromosomale Aberrationen, nicht aber tumorigenes Potenzial in Nacktmäusen**

Frühere Studien beweisen anhand von Experimenten an BRK-Zellen, dass die morphologische Zelltransformation durch Expression adenoviraler Onkogene auch mit einem tumorigenen Potenzial dieser Zellen in immundefizienten Nacktmäusen einhergehen kann. Hoch tumorigen zeigten sich dabei insbesondere ABS- und ABST-Zellen, also solche Zellen, die mit E1A, E1B-55K und E4orf6 bzw. E1A, E1B-55K, E4orf3 und E4orf6 behandelt worden waren (Nevels *et al.*, 2000; Nevels *et al.*, 1999a; Nevels *et al.*, 1999b). Bei den in der

vorliegenden Arbeit untersuchten Zelllinien hMSC AB Klon 9 und 10 sowie dem Zellpool, dem diese Klone entstammten, konnte kein tumorigenes Potenzial in Nacktmäusen bestätigt werden. Allein die in einer früheren Arbeit generierte Rattenzelllinie ABS1 (Nevels *et al.*, 2000) induzierte ein deutlich sichtbares Tumorwachstum in den damit behandelten Tieren (5.4.7.). Die zytogenetische Analyse der hMSC-Klone 9 und 10 zeigte ebenfalls nur teilweise chromosomale Veränderungen in diesen Zellen. Bei einem Großteil der Metaphasenpräparate dieser beiden Klone wurden normale (diploide) Chromosomensätze festgestellt, lediglich ein Teil der untersuchten Zellen wies Tetraploidie auf (5.4.8.). Komplexe Veränderungen in allen Zellen dieser Zelllinien hätten möglicherweise auch zu einer Tumorigenese in Nacktmäusen geführt. Eine längere Passagendauer der Zellen hätte dabei eventuell eine Selektion auf einen veränderten Karyotyp begünstigen können. Diese Vermutung wird zusätzlich dadurch unterstrichen, dass nur die nicht im Tierversuch untersuchte Zelllinie hMSC AB Klon 1 auffällige chromosomale Aberrationen in allen untersuchten Zellen zeigte. Die Aberrationen bestanden hierbei in Deletionen ganzer Chromosomen. Zusätzlich waren Markerchromosomen vorhanden, die vermutlich Teile der deletierten Chromosomen enthielten (5.4.8.). Solche Markerchromosomen (sSMC = *small supernumerary marker chromosomes*) können interessanterweise tatsächlich ein Charakteristikum von Tumorzellen sein (Minamihisamatsu *et al.*, 1988; Rogatto *et al.*, 1999; Starke *et al.*, 2001). Ob komplexe chromosomale Veränderungen adenoviral transformierter Zelllinien auch die Tumorigenität dieser Zellen in Nacktmäusen bedingen, wird jedoch in weiteren Arbeiten zu untersuchen sein.

## 6.8. Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass primäre humane mesenchymale Stromazellen eine Zellspezies sein können, die präferenziell durch die stabile Expression der adenoviralen Onkogene E1A und E1B-55K transformierbar ist. Die im Zuge der Transformation beobachteten Veränderungen schließen sowohl deutliche morphologische Abweichungen vom Phänotyp der Primärzellen wie auch teilweise beschleunigtes Proliferationsverhalten der transformierten Zellen ein. Hinzu kommt eine erhöhte Telomeraseaktivität in den transformierten Zellen. Zusätzlich kann die Transformation der Zellen mit komplexen chromosomalen Veränderungen einhergehen. Ob die beobachteten Veränderungen der Zellen einer onkogenen Transformation entsprechen, werden weitere Experimente im Tiermodell zu klären haben, da in der vorliegenden Arbeit zu wenige

Zellklone untersucht worden sind, um diesbezüglich eine verlässliche Aussage abzuleiten. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass insbesondere humane mesenchymale Stromazellen, möglicherweise neben anderen, bislang unbekanntem Zelltypen, eine Zellspezies des menschlichen Organismus darstellen, in der eine abortive Adenovirusinfektion eine onkogene Transformation nach sich ziehen kann. Da es sich bei diesem Zelltyp um Progenitorzellen handelt, könnte ihre Teilungsfähigkeit in diesem Zusammenhang einen Vorteil bedeuten. Es ist hinlänglich bekannt, dass verschiedene Arten von Sarkomen aus mesenchymalen Stromazellen hervorgehen (Helman and Meltzer, 2003). Darüber hinaus weiß man, dass Adenoviren solche Tumore in Nagern induzieren können (Graham, 1984). Die meisten Sarkome zeichnen sich durch Anomalien in Signalwegen aus, in denen pRb und/oder p53 eine zentrale Rolle spielen (Choi *et al.*, 2010; Helman and Meltzer, 2003), zelluläre Faktoren, deren normale Funktion nachhaltig durch die Expression von E1A und E1B-55K, aber auch anderen adenoviralen Onkogenen, beeinträchtigt wird. Ferner könnten eine durch E1A und E1B-55K bedingte erhöhte Telomeraseaktivität sowie eine akkumulierte chromosomale Instabilität, wie in der vorliegenden Arbeit beobachtet, eine onkogene Transformation und damit die mögliche Entstehung von Sarkomen unterstützen. Ein gezieltes Screening von Proben aus verschiedenen Sarkomen auf die Anwesenheit adenoviraler DNA würde in diesem Zusammenhang Aufschluss über eine mögliche Assoziation humaner Adenoviren mit der Entstehung jener Tumore geben. Ferner wäre es hochinteressant, humane mesenchymale Stromazellen mit Adenoviruspartikeln zu infizieren, deren Replikationskompetenz eingeschränkt oder ganz ausgeschaltet ist. Solche experimentellen Bedingungen würden eine Annäherung an das Szenario einer abortiven Adenovirusinfektion ermöglichen. Sollte es dabei zur Zelltransformation kommen, würde dieses die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse unterstreichen und die Hypothese unterstützen, dass humane Adenoviren Tumorigenese des Menschen sein können. Darüber hinaus könnte aufgrund solcher Erkenntnisse zusätzlich zu den in dieser Arbeit sowie in zahlreichen anderen Studien erzielten Ergebnissen eine Allgemeingültigkeit abgeleitet werden, nach der prinzipiell alle infektiösen Agenzien, die im Rahmen ihres Infektionsverlaufs Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur sowie Seneszenz- und Apoptosemechanismen humaner Zellen beeinflussen, ernstzunehmende Faktoren bezüglich der Auslösung von Krebserkrankungen beim Menschen darstellen können.

## LITERATUR

Abe S, Miyamura K, Oba T, Terakura S, Kasai M, Kitaori K et al (2003). Oral ribavirin for severe adenovirus infection after allogeneic marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* **32**: 1107-8.

Akagi T (2004). Oncogenic transformation of human cells: shortcomings of rodent model systems. *Trends Mol Med* **10**: 542-8.

Allard A, Albinsson B, Wadell G (1992). Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. *J Med Virol* **37**: 149-57.

Allsopp RC, Chang E, Kashefi-Aazam M, Rogaev EI, Piatyszek MA, Shay JW et al (1995). Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* **220**: 194-200.

Ambinder RF (2000). Gammaherpesviruses and "Hit-and-Run" oncogenesis. *Am J Pathol* **156**: 1-3.

Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA et al (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* **227**: 271-8.

Ankerst J, Jonsson N (1989). Adenovirus type 9-induced tumorigenesis in the rat mammary gland related to sex hormonal state. *J Natl Cancer Inst* **81**: 294-8.

Ankerst J, Jonsson N, Kjellen L, Norrby E, Sjogren HO (1974). Induction of mammary fibroadenomas in rats by adenovirus type 9. *Int J Cancer* **13**: 286-90.

Araujo FD, Stracker TH, Carson CT, Lee DV, Weitzman MD (2005). Adenovirus type 5 E4orf3 protein targets the Mre11 complex to cytoplasmic aggresomes. *J Virol* **79**: 11382-91.

Asker C, Wiman KG, Selivanova G (1999). p53-induced apoptosis as a safeguard against cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **265**: 1-6.

Assenmacher N, Hopfner KP (2004). MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. *Chromosoma* **113**: 157-66.

Atkinson RL, Dhurandhar NV, Allison DB, Bowen RL, Israel BA, Albu JB et al (2005). Human adenovirus-36 is associated with increased body weight and paradoxical reduction of serum lipids. *Int J Obes (Lond)* **29**: 281-6.

Baker A, Rohleder KJ, Hanakahi LA, Ketner G (2007). Adenovirus E4 34k and E1b 55k oncoproteins target host DNA ligase IV for proteasomal degradation. *J Virol* **81**: 7034-40.

Barbanti-Brodano G, Sabbioni S, Martini F, Negrini M, Corallini A, Tognon M (2004). Simian virus 40 infection in humans and association with human diseases: results and hypotheses. *Virology* **318**: 1-9.

Beck KF, Stathopoulos I, Berninger MG, Schweizer M (1993). Overcoming GC compression in nucleotide sequencing. *Biotechniques* **14**: 375.

Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS et al (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**: 1320-3.

Berk AJ (2005). Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene* **24**: 7673-85.

Berk AJ (2007). *Adenoviridae: The viruses and their replication*. Raven Press: New York.

Bernards R, de Leeuw MG, Houweling A, van der Eb AJ (1986). Role of the adenovirus early region 1B tumor antigens in transformation and lytic infection. *Virology* **150**: 126-39.

Bernards R, Houweling A, Schrier PI, Bos JL, Van der Eb AJ (1982). Characterization of cells transformed by Ad5/Ad12 hybrid early region I plasmids. *Virology* **120**: 422-32.

Bernards R, Van der Eb AJ (1984). Adenovirus: transformation and oncogenicity. *Biochim Biophys Acta* **783**: 187-204.

Beyer WR, Westphal M, Ostertag W, von Laer D (2002). Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range. *J Virol* **76**: 1488-95.

Blair Zajdel ME, Blair GE (1988). The intracellular distribution of the transformation-associated protein p53 in adenovirus-transformed rodent cells. *Oncogene* **2**: 579-84.

Blanchette P, Cheng CY, Yan Q, Ketner G, Ornelles DA, Dobner T et al (2004). Both BC-box motifs of adenovirus protein E4orf6 are required to efficiently assemble an E3 ligase complex that degrades p53. *Mol Cell Biol* **24**: 9619-29.

Bos JL, Polder LJ, Bernards R, Schrier PI, van den Elsen PJ, van der Eb AJ et al (1981). The 2.2 kb E1b mRNA of human Ad12 and Ad5 codes for two tumor antigens starting at different AUG triplets. *Cell* **27**: 121-31.

Bossolasco P, Montemurro T, Cova L, Zangrossi S, Calzarossa C, Buiatitot S et al (2006). Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. *Cell Res* **16**: 329-36.

Boyer J, Rohleder K, Ketner G (1999). Adenovirus E4 34k and E4 11k inhibit double strand break repair and are physically associated with the cellular DNA-dependent protein kinase. *Virology* **263**: 307-12.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.

Bridge E, Ketner G (1989). Redundant control of adenovirus late gene expression by early region 4. *J Virol* **63**: 631-8.

Bridge E, Ketner G (1990). Interaction of adenoviral E4 and E1b products in late gene expression. *Virology* **174**: 345-53.

Burgert HG, Ruzsics Z, Obermeier S, Hilgendorf A, Windheim M, Elsing A (2002). Subversion of host defense mechanisms by adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **269**: 273-318.

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

Carvalho T, Seeler JS, Ohman K, Jordan P, Pettersson U, Akusjarvi G et al (1995). Targeting of adenovirus E1A and E4-ORF3 proteins to nuclear matrix-associated PML bodies. *J Cell Biol* **131**: 45-56.

Cathomas G, Tamm M, McGandy CE, Perruchoud AP, Mihatsch MJ, Dalquen P (1996). Detection of herpesvirus-like DNA in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with pulmonary Kaposi's sarcoma. *Eur Respir J* **9**: 1743-6.

Cathomen T, Weitzman MD (2000). A functional complex of adenovirus proteins E1B-55kDa and E4orf6 is necessary to modulate the expression level of p53 but not its transcriptional activity. *J Virol* **74**: 11407-12.

Cheng CY, Gilson T, Dallaire F, Ketner G, Branton PE, Blanchette P (2011). The E4orf6/E1B55K E3 ubiquitin ligase complexes of human adenoviruses exhibit heterogeneity in composition and substrate specificity. *J Virol* **85**: 765-75.

Choi J, Curtis SJ, Roy DM, Flesken-Nikitin A, Nikitin AY (2010). Local mesenchymal stem/progenitor cells are a preferential target for initiation of adult soft tissue sarcomas associated with p53 and Rb deficiency. *Am J Pathol* **177**: 2645-58.

Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* **193**: 3-34.

Collins K (2000). Mammalian telomeres and telomerase. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 378-83.

Cook JL, Lewis AM, Jr. (1987). Immunological surveillance against DNA-virus-transformed cells: correlations between natural killer cell cytolytic competence and tumor susceptibility of athymic rodents. *J Virol* **61**: 2155-61.

Cook JL, May DL, Lewis AM, Jr., Walker TA (1987). Adenovirus E1A gene induction of susceptibility to lysis by natural killer cells and activated macrophages in infected rodent cells. *J Virol* **61**: 3510-20.

Cox LS, Lane DP (1995). Tumour suppressors, kinases and clamps: how p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage. *Bioessays* **17**: 501-8.

Davison AJ, Benko M, Harrach B (2003). Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol* **84**: 2895-908.

Dellaire G, Bazett-Jones DP (2004). PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *Bioessays* **26**: 963-77.

- Dolph PJ, Racaniello V, Villamarin A, Palladino F, Schneider RJ (1988). The adenovirus tripartite leader may eliminate the requirement for cap-binding protein complex during translation initiation. *J Virol* **62**: 2059-66.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**: 315-7.
- Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D et al (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* **72**: 8463-71.
- Dyson N, Harlow E (1992). Adenovirus E1A targets key regulators of cell proliferation. *Cancer Surv* **12**: 161-95.
- Elgui de Oliveira D (2007). DNA viruses in human cancer: an integrated overview on fundamental mechanisms of viral carcinogenesis. *Cancer Lett* **247**: 182-96.
- Elliott WM, Hayashi S, Hogg JC (1995). Immunodetection of adenoviral E1A proteins in human lung tissue. *Am J Respir Cell Mol Biol* **12**: 642-8.
- Endter C, Dobner T (2004). Cell transformation by human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **273**: 163-214.
- Evans JD, Hearing P (2005). Relocalization of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex by the adenovirus E4 ORF3 protein is required for viral replication. *J Virol* **79**: 6207-15.
- Fallaux FJ, Kranenburg O, Cramer SJ, Houweling A, Van Ormondt H, Hoeben RC et al (1996). Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* **7**: 215-22.
- Farrell PJ, Cludts I, Stuhler A (1997). Epstein-Barr virus genes and cancer cells. *Biomed Pharmacother* **51**: 258-67.
- Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS (2008). Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* **319**: 1096-100.
- Flint SJ (2008). Principles of virology. ASM Press: Washington D. C.
- Forrester NA, Sedgwick GG, Thomas A, Blackford AN, Speiseder T, Dobner T et al (2011). Serotype-specific inactivation of the cellular DNA damage response during adenovirus infection. *J Virol* **85**: 2201-11.
- Gallimore PH, Grand RJ, Byrd PJ (1986). Transformation of human embryo retinoblasts with simian virus 40, adenovirus and ras oncogenes. *Anticancer Res* **6**: 499-508.
- Garnett CT, Talekar G, Mahr JA, Huang W, Zhang Y, Ornelles DA et al (2009). Latent species C adenoviruses in human tonsil tissues. *J Virol* **83**: 2417-28.
- Giaccia AJ, Kastan MB (1998). The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* **12**: 2973-83.

Gissmann L, deVilliers EM, zur Hausen H (1982). Analysis of human genital warts (condylomata acuminata) and other genital tumors for human papillomavirus type 6 DNA. *Int J Cancer* **29**: 143-6.

Gosden CM (1983). Amniotic fluid cell types and culture. *Br Med Bull* **39**: 348-54.

Graham FL (1984). Transformation and oncogenicity of human adenoviruses. Plenum Press: New York.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**: 59-74.

Grassmann R, Dengler C, Muller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, McGuire K, Dokhelar MC et al (1989). Transformation to continuous growth of primary human T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type I X-region genes transduced by a Herpesvirus saimiri vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 3351-5.

Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I et al (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15655-60.

Guillot PV, Gotherstrom C, Chan J, Kurata H, Fisk NM (2007). Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. *Stem Cells* **25**: 646-54.

Halbert DN, Cutt JR, Shenk T (1985). Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *J Virol* **56**: 250-7.

Hanahan D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-80.

Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.

Harada JN, Shevchenko A, Shevchenko A, Pallas DC, Berk AJ (2002). Analysis of the adenovirus E1B-55K-anchored proteome reveals its link to ubiquitination machinery. *J Virol* **76**: 9194-206.

Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**: 458-60.

Harlow E, Franza BR, Jr., Schley C (1985). Monoclonal antibodies specific for adenovirus early region 1A proteins: extensive heterogeneity in early region 1A products. *J Virol* **55**: 533-46.

Hartl B, Zeller T, Blanchette P, Kremmer E, Dobner T (2008). Adenovirus type 5 early region 1B 55-kDa oncoprotein can promote cell transformation by a mechanism independent from blocking p53-activated transcription. *Oncogene* **27**: 3673-84.

Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *Embo J* **8**: 3905-10.

Helman LJ, Meltzer P (2003). Mechanisms of sarcoma development. *Nat Rev Cancer* **3**: 685-94.

Hessein M, Saad el G, Mohamed AA, Kamel el AM, Abdel Hady AM, Amina M et al (2005). Hit-and-run mechanism of HBV-mediated progression to hepatocellular carcinoma. *Tumori* **91**: 241-7.

Hilleman MR, Werner JH (1954). Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc Soc Exp Biol Med* **85**: 183-8.

Hoehn H, Salk D (1982). Morphological and biochemical heterogeneity of amniotic fluid cells in culture. *Methods Cell Biol* **26**: 11-34.

Horikawa I, Barrett JC (2003). Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms. *Carcinogenesis* **24**: 1167-76.

Horwitz MS (2001). Adenovirus immunoregulatory genes and their cellular targets. *Virology* **279**: 1-8.

Houweling A, van den Elsen PJ, van der Eb AJ (1980). Partial transformation of primary rat cells by the leftmost 4.5% fragment of adenovirus 5 DNA. *Virology* **105**: 537-50.

Huang L, Snyder AR, Morgan WF (2003). Radiation-induced genomic instability and its implications for radiation carcinogenesis. *Oncogene* **22**: 5848-54.

Huang MM, Hearing P (1989). Adenovirus early region 4 encodes two gene products with redundant effects in lytic infection. *J Virol* **63**: 2605-15.

Hutton FG, Turnell AS, Gallimore PH, Grand RJ (2000). Consequences of disruption of the interaction between p53 and the larger adenovirus early region 1B protein in adenovirus E1 transformed human cells. *Oncogene* **19**: 452-62.

In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R et al (2003). Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* **102**: 1548-9.

Iwasaka T, Hayashi Y, Yokoyama M, Hara K, Matsuo N, Sugimori H (1992). 'Hit and run' oncogenesis by human papillomavirus type 18 DNA. *Acta Obstet Gynecol Scand* **71**: 219-23.

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP (1997). Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* **64**: 295-312.

Javier R, Raska K, Jr., Macdonald GJ, Shenk T (1991). Human adenovirus type 9-induced rat mammary tumors. *J Virol* **65**: 3192-202.

Jonsson N, Ankerst J (1977). Studies on adenovirus type 9-induced mammary fibroadenomas in rats and their malignant transformation. *Cancer* **39**: 2513-9.

Kao CC, Yew PR, Berk AJ (1990). Domains required for in vitro association between the cellular p53 and the adenovirus 2 E1B 55K proteins. *Virology* **179**: 806-14.

- Kaviani A, Guleserian K, Perry TE, Jennings RW, Ziegler MM, Fauza DO (2003). Fetal tissue engineering from amniotic fluid. *J Am Coll Surg* **196**: 592-7.
- Khalili K, Del Valle L, Otte J, Weaver M, Gordon J (2003). Human neurotropic polyomavirus, JCV, and its role in carcinogenesis. *Oncogene* **22**: 5181-91.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL et al (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**: 2011-5.
- Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK (1996). Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* **380**: 79-82.
- Kosulin K, Haberler C, Hainfellner JA, Amann G, Lang S, Lion T (2007). Investigation of adenovirus occurrence in pediatric tumor entities. *J Virol* **81**: 7629-35.
- Kuhlmann I, Achten S, Rudolph R, Doerfler W (1982). Tumor induction by human adenovirus type 12 in hamsters: loss of the viral genome from adenovirus type 12-induced tumor cells is compatible with tumor formation. *Embo J* **1**: 79-86.
- Kuwano K, Kawasaki M, Kunitake R, Hagimoto N, Nomoto Y, Matsuba T et al (1997). Detection of group C adenovirus DNA in small-cell lung cancer with the nested polymerase chain reaction. *J Cancer Res Clin Oncol* **123**: 377-82.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.
- Lavia P, Mileo AM, Giordano A, Paggi MG (2003). Emerging roles of DNA tumor viruses in cell proliferation: new insights into genomic instability. *Oncogene* **22**: 6508-16.
- Levine AJ (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**: 323-31.
- Liu Y, Shevchenko A, Shevchenko A, Berk AJ (2005). Adenovirus exploits the cellular aggresome response to accelerate inactivation of the MRN complex. *J Virol* **79**: 14004-16.
- Lomonte P, Morency E (2007). Centromeric protein CENP-B proteasomal degradation induced by the viral protein ICP0. *FEBS Lett* **581**: 658-62.
- Machida K, Cheng KT, Sung VM, Shimodaira S, Lindsay KL, Levine AM et al (2004). Hepatitis C virus induces a mutator phenotype: enhanced mutations of immunoglobulin and protooncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 4262-7.
- Marcellus RC, Teodoro JG, Charbonneau R, Shore GC, Branton PE (1996). Expression of p53 in Saos-2 osteosarcoma cells induces apoptosis which can be inhibited by Bcl-2 or the adenovirus E1B-55 kDa protein. *Cell Growth Differ* **7**: 1643-50.
- Martens UM, Chavez EA, Poon SS, Schmoor C, Lansdorp PM (2000). Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Exp Cell Res* **256**: 291-9.

- McLaughlin GE, Delis S, Kashimawo L, Cantwell GP, Mittal N, Cirocco RE et al (2003). Adenovirus infection in pediatric liver and intestinal transplant recipients: utility of DNA detection by PCR. *Am J Transplant* **3**: 224-8.
- McLorie W, McGlade CJ, Takayesu D, Branton PE (1991). Individual adenovirus E1B proteins induce transformation independently but by additive pathways. *J Gen Virol* **72** ( Pt **6**): 1467-71.
- McNees AL, Gooding LR (2002). Adenoviral inhibitors of apoptotic cell death. *Virus Res* **88**: 87-101.
- Minamihisamatsu M, Gregorio JS, Onozawa Y, Ishihara T (1988). Acute nonlymphocytic leukemia following lung cancer in a patient with a constitutional supernumerary chromosome. *Cancer Genet Cytogenet* **35**: 263-8.
- Modrow S, Falke D (2002). *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg.
- Mohammadi ES, Ketner EA, Johns DC, Ketner G (2004). Expression of the adenovirus E4 34k oncoprotein inhibits repair of double strand breaks in the cellular genome of a 293-based inducible cell line. *Nucleic Acids Res* **32**: 2652-9.
- Moore M, Horikoshi N, Shenk T (1996). Oncogenic potential of the adenovirus E4orf6 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 11295-301.
- Moran E, Grodzicker T, Roberts RJ, Mathews MB, Zerler B (1986). Lytic and transforming functions of individual products of the adenovirus E1A gene. *J Virol* **57**: 765-75.
- Morgan WF, Day JP, Kaplan MI, McGhee EM, Limoli CL (1996). Genomic instability induced by ionizing radiation. *Radiat Res* **146**: 247-58.
- Mukai N, Bowers WC (1975). [Viruses and brain tumors (author's transl)]. *No Shinkei Geka* **3**: 91-112.
- Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH et al (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**: 263-7.
- Nevels M, Rubenwolf S, Spruss T, Wolf H, Dobner T (1997). The adenovirus E4orf6 protein can promote E1A/E1B-induced focus formation by interfering with p53 tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 1206-11.
- Nevels M, Rubenwolf S, Spruss T, Wolf H, Dobner T (2000). Two distinct activities contribute to the oncogenic potential of the adenovirus type 5 E4orf6 protein. *J Virol* **74**: 5168-81.
- Nevels M, Spruss T, Wolf H, Dobner T (1999a). The adenovirus E4orf6 protein contributes to malignant transformation by antagonizing E1A-induced accumulation of the tumor suppressor protein p53. *Oncogene* **18**: 9-17.

- Nevels M, Tauber B, Kremmer E, Spruss T, Wolf H, Dobner T (1999b). Transforming potential of the adenovirus type 5 E4orf3 protein. *J Virol* **73**: 1591-600.
- Nevels M, Tauber B, Spruss T, Wolf H, Dobner T (2001). "Hit-and-run" transformation by adenovirus oncogenes. *J Virol* **75**: 3089-94.
- Nevins JR (1992). E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* **258**: 424-9.
- Nevins JR, Leone G, DeGregori J, Jakoi L (1997). Role of the Rb/E2F pathway in cell growth control. *J Cell Physiol* **173**: 233-6.
- Nevins JR, Vogt PK (2007). *Cell transformation by viruses*. Lippincott Williams & Wilkins: New York.
- Nicolas AL, Munz PL, Falck-Pedersen E, Young CS (2000). Creation and repair of specific DNA double-strand breaks in vivo following infection with adenovirus vectors expressing *Saccharomyces cerevisiae* HO endonuclease. *Virology* **266**: 211-24.
- Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE (2011). The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 126-31.
- Paraskeva C, Brown KW, Dunn AR, Gallimore PH (1982). Adenovirus type 12-transformed rat embryo brain and rat liver epithelial cell lines: adenovirus type 12 genome content and viral protein expression. *J Virol* **44**: 759-64.
- Paraskeva C, Gallimore PH (1980). Tumorigenicity and in vitro characteristics of rat liver epithelial cells and their adenovirus-transformed derivatives. *Int J Cancer* **25**: 631-9.
- Parkin DM (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* **118**: 3030-44.
- Perricaudet M, Akusjarvi G, Virtanen A, Pettersson U (1979). Structure of two spliced mRNAs from the transforming region of human subgroup C adenoviruses. *Nature* **281**: 694-6.
- Pfeffer A, Schubbert R, Orend G, Hilger-Eversheim K, Doerfler W (1999). Integrated viral genomes can be lost from adenovirus type 12-induced hamster tumor cells in a clone-specific, multistep process with retention of the oncogenic phenotype. *Virus Res* **59**: 113-27.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**: 143-7.
- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 7415-9.
- Prives C, Hall PA (1999). The p53 pathway. *J Pathol* **187**: 112-26.
- Prusa AR, Hengstschlager M (2002). Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection. *Med Sci Monit* **8**: RA253-7.

- Puvion-Dutilleul F, Chelbi-Alix MK, Koken M, Quignon F, Puvion E, de The H (1995). Adenovirus infection induces rearrangements in the intranuclear distribution of the nuclear body-associated PML protein. *Exp Cell Res* **218**: 9-16.
- Querido E, Morrison MR, Chu-Pham-Dang H, Thirlwell SW, Boivin D, Branton PE (2001). Identification of three functions of the adenovirus e4orf6 protein that mediate p53 degradation by the E4orf6-E1B55K complex. *J Virol* **75**: 699-709.
- Rao L, Debbas M, Sabbatini P, Hockenbery D, Korsmeyer S, White E (1992). The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 7742-6.
- Raska K, Jr., Gallimore PH (1982). An inverse relation of the oncogenic potential of adenovirus-transformed cells and their sensitivity to killing by syngeneic natural killer cells. *Virology* **123**: 8-18.
- Regad T, Chelbi-Alix MK (2001). Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene* **20**: 7274-86.
- Rogatto SR, Rainho CA, Zhang ZM, Figueiredo F, Barbieri-Neto J, Georgetto SM et al (1999). Hemangioendothelioma of bone in a patient with a constitutional supernumerary marker. *Cancer Genet Cytogenet* **110**: 23-7.
- Roth J, Konig C, Wienzek S, Weigel S, Ristea S, Dobbelstein M (1998). Inactivation of p53 but not p73 by adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton and E4 34-kilodalton oncoproteins. *J Virol* **72**: 8510-6.
- Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* **84**: 570-3.
- Rubenwolf S, Schutt H, Nevels M, Wolf H, Dobner T (1997). Structural analysis of the adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton-E4orf6 protein complex. *J Virol* **71**: 1115-23.
- Russell WC (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* **81**: 2573-604.
- Russell WC (2009). Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol* **90**: 1-20.
- Sabbatini P, Lin J, Levine AJ, White E (1995). Essential role for p53-mediated transcription in E1A-induced apoptosis. *Genes Dev* **9**: 2184-92.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT et al (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-91.
- Sakuragawa N, Thangavel R, Mizuguchi M, Hirasawa M, Kamo I (1996). Expression of markers for both neuronal and glial cells in human amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett* **209**: 9-12.

- Sarnow P, Sullivan CA, Levine AJ (1982). A monoclonal antibody detecting the adenovirus type 5-E1b-58Kd tumor antigen: characterization of the E1b-58Kd tumor antigen in adenovirus-infected and -transformed cells. *Virology* **120**: 510-7.
- Scheffner M, Munger K, Byrne JC, Howley PM (1991). The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 5523-7.
- Schiedner G, Hertel S, Kochanek S (2000). Efficient transformation of primary human amniocytes by E1 functions of Ad5: generation of new cell lines for adenoviral vector production. *Hum Gene Ther* **11**: 2105-16.
- Shakibaei M, De Souza P (1997). Differentiation of mesenchymal limb bud cells to chondrocytes in alginate beads. *Cell Biol Int* **21**: 75-86.
- Sharma RC, Schimke RT (1996). Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium. *Biotechniques* **20**: 42-4.
- Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham FL (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *Faseb J* **16**: 869-71.
- Shen Y, Kitzes G, Nye JA, Fattaey A, Hermiston T (2001). Analyses of single-amino-acid substitution mutants of adenovirus type 5 E1B-55K protein. *J Virol* **75**: 4297-307.
- Shen Y, Zhu H, Shenk T (1997). Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate "hit-and-run" oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 3341-5.
- Shenk T (2001). *Adenoviridae: The viruses and their replication*. Lippincott-Raven: New York.
- Si H, Robertson ES (2006). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded latency-associated nuclear antigen induces chromosomal instability through inhibition of p53 function. *J Virol* **80**: 697-709.
- Sidle A, Palaty C, Dirks P, Wiggan O, Kiess M, Gill RM et al (1996). Activity of the retinoblastoma family proteins, pRB, p107, and p130, during cellular proliferation and differentiation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **31**: 237-71.
- Skinner GR (1976). Transformation of primary hamster embryo fibroblasts by type 2 simplex virus: evidence for a "hit and run" mechanism. *Br J Exp Pathol* **57**: 361-76.
- Starke H, Raida M, Trifonov V, Clement JH, Loncarevic IF, Heller A et al (2001). Molecular cytogenetic characterization of an acquired minute supernumerary marker chromosome as the sole abnormality in a case clinically diagnosed as atypical Philadelphia-negative chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* **113**: 435-8.
- Steegenga WT, Riteco N, Jochemsen AG, Fallaux FJ, Bos JL (1998). The large E1B protein together with the E4orf6 protein target p53 for active degradation in adenovirus infected cells. *Oncogene* **16**: 349-57.

Stewart PL, Fuller SD, Burnett RM (1993). Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *Embo J* **12**: 2589-99.

Stracker TH, Carson CT, Weitzman MD (2002). Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11-Rad50-NBS1 DNA repair complex. *Nature* **418**: 348-52.

Stracker TH, Lee DV, Carson CT, Araujo FD, Ornelles DA, Weitzman MD (2005). Serotype-specific reorganization of the Mre11 complex by adenoviral E4orf3 proteins. *J Virol* **79**: 6664-73.

Szmunes W (1978). Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus: evidence for a causal association. *Prog Med Virol* **24**: 40-69.

Tauber B, Dobner T (2001a). Adenovirus early E4 genes in viral oncogenesis. *Oncogene* **20**: 7847-54.

Tauber B, Dobner T (2001b). Molecular regulation and biological function of adenovirus early genes: the E4 ORFs. *Gene* **278**: 1-23.

Teodoro JG, Shore GC, Branton PE (1995). Adenovirus E1A proteins induce apoptosis by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene* **11**: 467-74.

Tognon M, Corallini A, Martini F, Negrini M, Barbanti-Brodano G (2003). Oncogenic transformation by BK virus and association with human tumors. *Oncogene* **22**: 5192-200.

Tooze J (1981). DNA tumor viruses. Cold Spring Harbor Laboratory: New York.

Trentin JJ, Yabe Y, Taylor G (1962). The quest for human cancer viruses. *Science* **137**: 835-41.

Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM (2004). Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod* **19**: 1450-6.

van den Heuvel SJ, The SI, Klein B, Jochemsen AG, Zantema A, van der Eb AJ (1992). p53 shares an antigenic determinant with proteins of 92 and 150 kilodaltons that may be involved in senescence of human cells. *J Virol* **66**: 591-5.

Vellinga J, Van der Heijdt S, Hoeben RC (2005). The adenovirus capsid: major progress in minor proteins. *J Gen Virol* **86**: 1581-8.

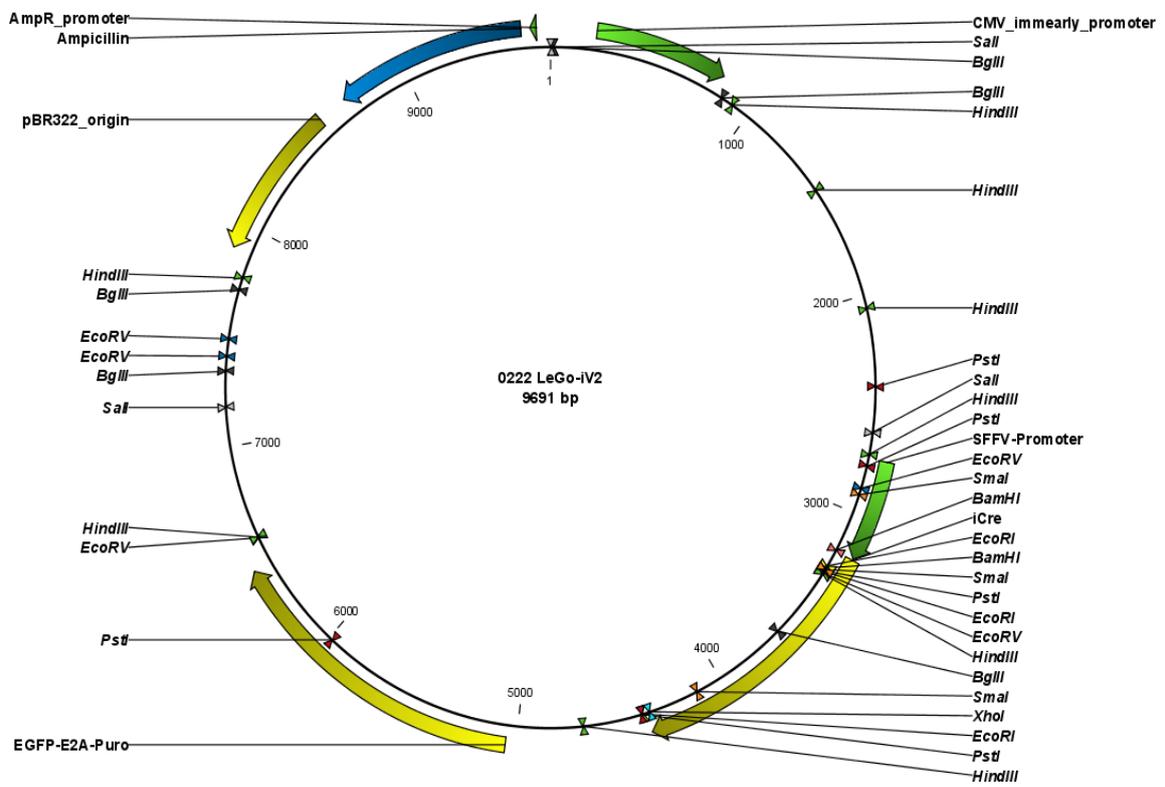
Weber K, Bartsch U, Stocking C, Fehse B (2008). A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol Ther* **16**: 698-706.

Weiden MD, Ginsberg HS (1994). Deletion of the E4 region of the genome produces adenovirus DNA concatemers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 153-7.

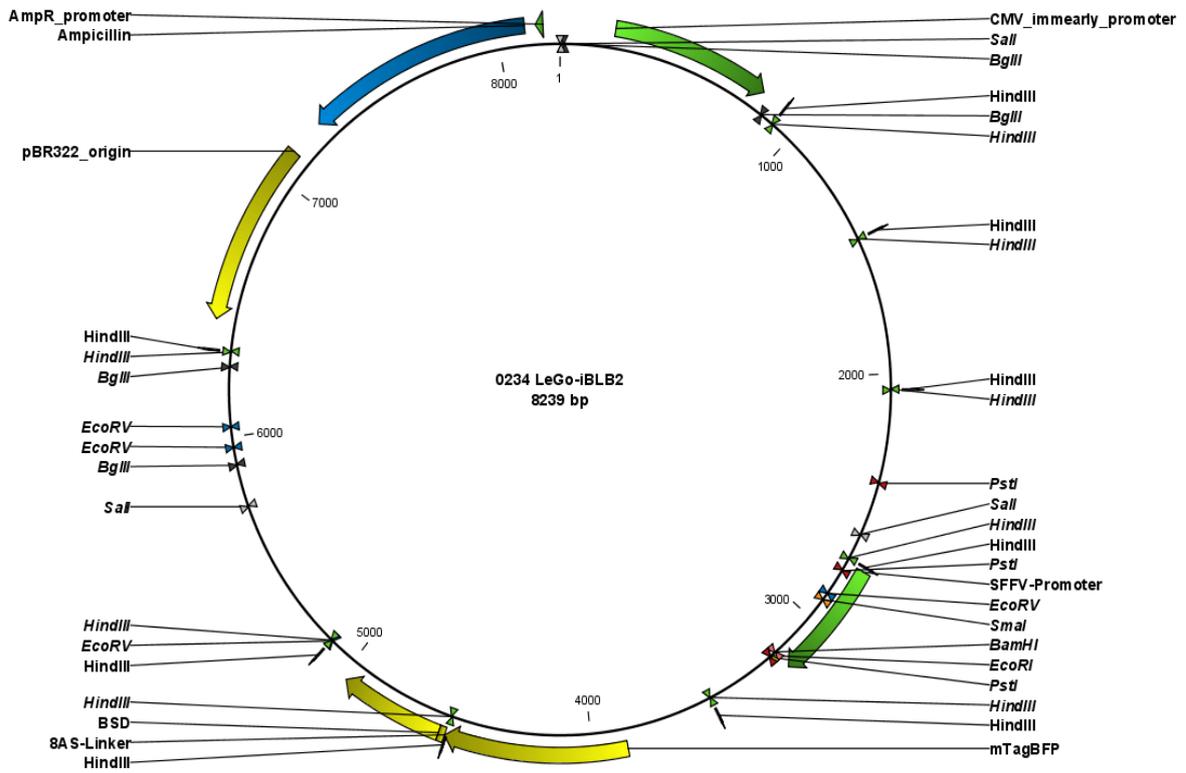
White E (1995). Regulation of p53-dependent apoptosis by E1A and E1B. *Curr Top Microbiol Immunol* **199 ( Pt 3)**: 34-58.

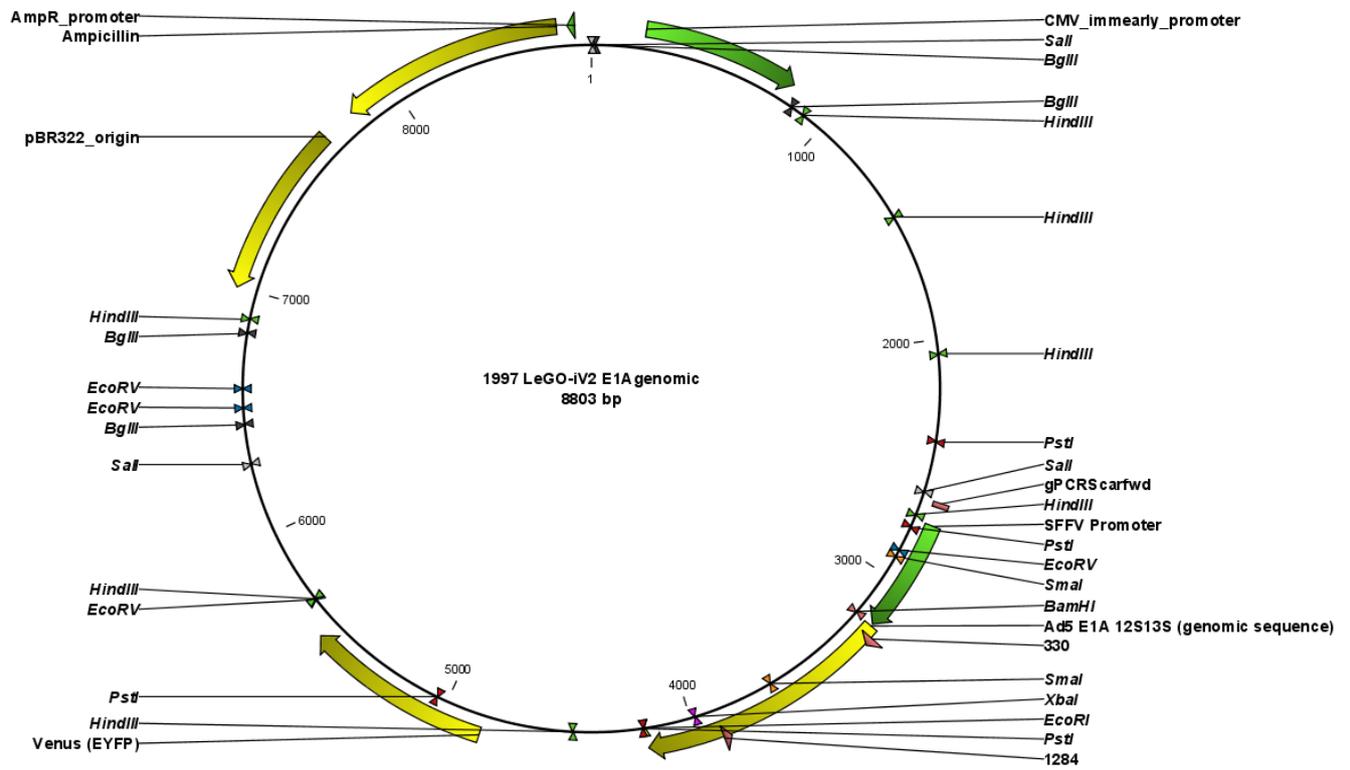
- White E, Cipriani R (1990). Role of adenovirus E1B proteins in transformation: altered organization of intermediate filaments in transformed cells that express the 19-kilodalton protein. *Mol Cell Biol* **10**: 120-30.
- Whittaker JL, Byrd PJ, Grand RJ, Gallimore PH (1984). Isolation and characterization of four adenovirus type 12-transformed human embryo kidney cell lines. *Mol Cell Biol* **4**: 110-6.
- Wienzek S, Roth J, Dobbstein M (2000). E1B 55-kilodalton oncoproteins of adenovirus types 5 and 12 inactivate and relocalize p53, but not p51 or p73, and cooperate with E4orf6 proteins to destabilize p53. *J Virol* **74**: 193-202.
- Williams J, Williams M, Liu C, Telling G (1995). Assessing the role of E1A in the differential oncogenicity of group A and group C human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **199** ( Pt 3): 149-75.
- Wimmer P, Tauber B, Spruss T, Dobner T (2010). Adenovirus type 5 early encoded proteins of the E1 and E4 regions induce oncogenic transformation of primary rabbit cells. *J Gen Virol* **91**: 1828-33.
- Wold WSM, Horwitz MS (2007). *Adenoviruses*. Raven Press: New York.
- Wu CL, Zukerberg LR, Ngwu C, Harlow E, Lees JA (1995). In vivo association of E2F and DP family proteins. *Mol Cell Biol* **15**: 2536-46.
- Wu L, Timmers C, Maiti B, Saavedra HI, Sang L, Chong GT et al (2001). The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* **414**: 457-62.
- Xu D, Wang Q, Gruber A, Bjorkholm M, Chen Z, Zaid A et al (2000). Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells. *Oncogene* **19**: 5123-33.
- Yew PR, Berk AJ (1992). Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature* **357**: 82-5.
- Yew PR, Liu X, Berk AJ (1994). Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. *Genes Dev* **8**: 190-202.
- Zantema A, Fransen JA, Davis-Olivier A, Ramaekers FC, Vooijs GP, DeLeys B et al (1985). Localization of the E1B proteins of adenovirus 5 in transformed cells, as revealed by interaction with monoclonal antibodies. *Virology* **142**: 44-58.
- Zimmermann S, Voss M, Kaiser S, Kapp U, Waller CF, Martens UM (2003). Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia* **17**: 1146-9.

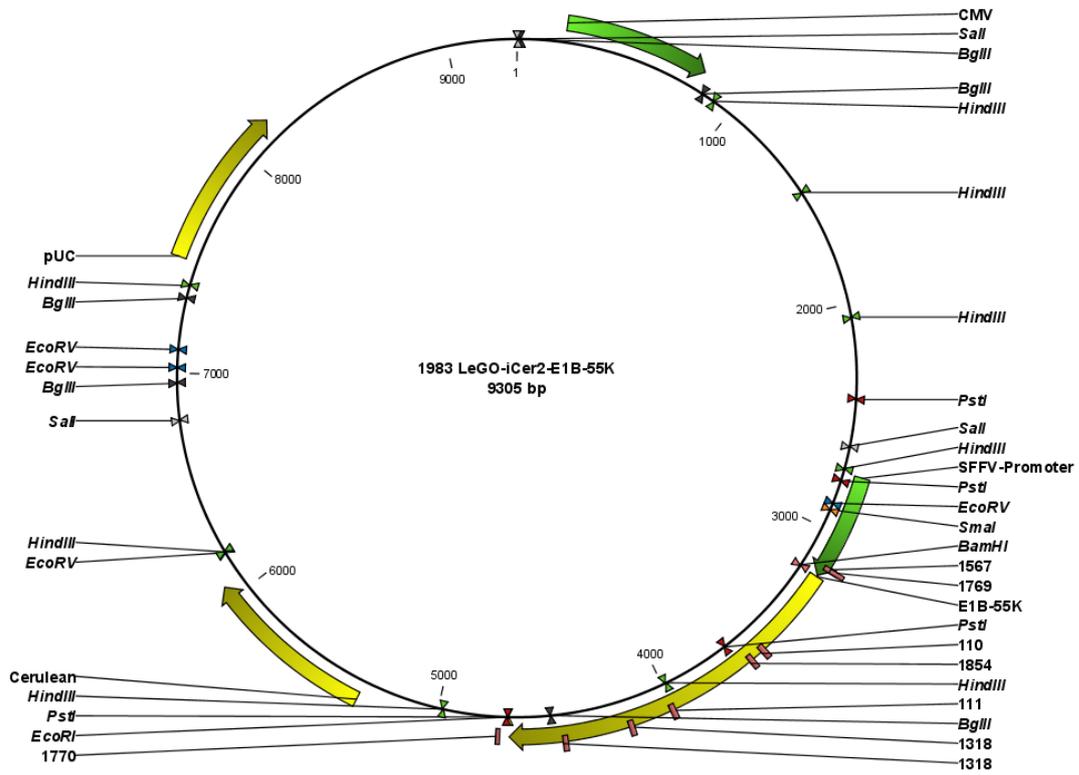
## ANHANG

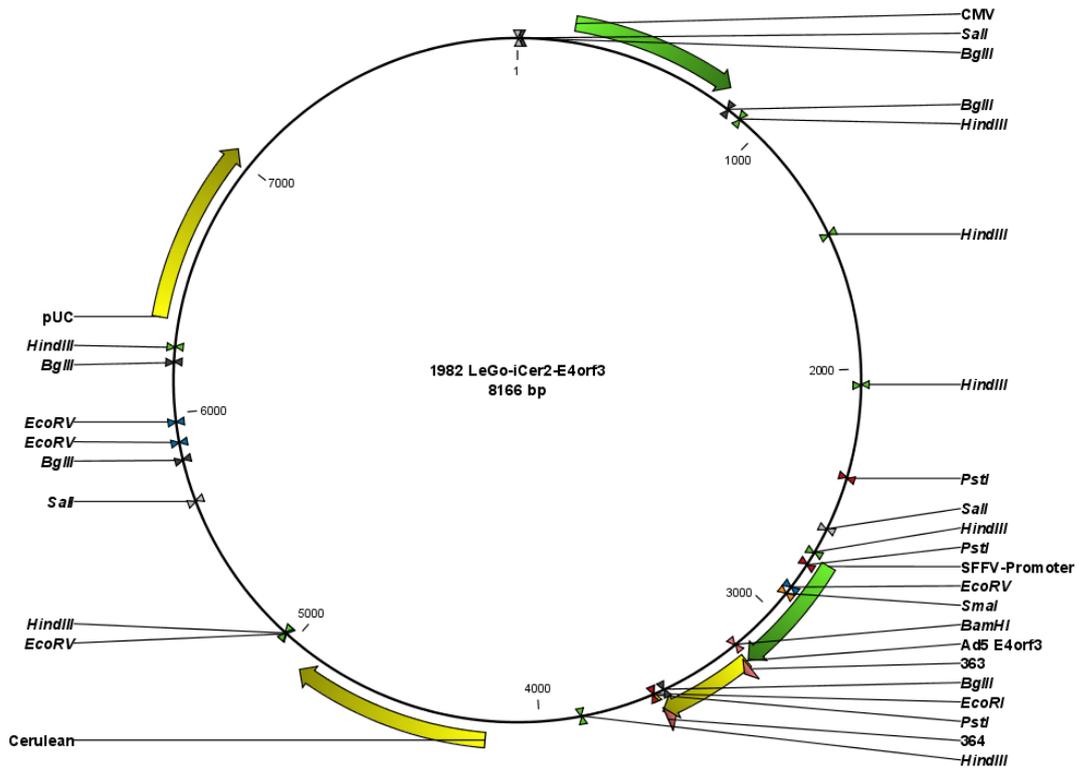


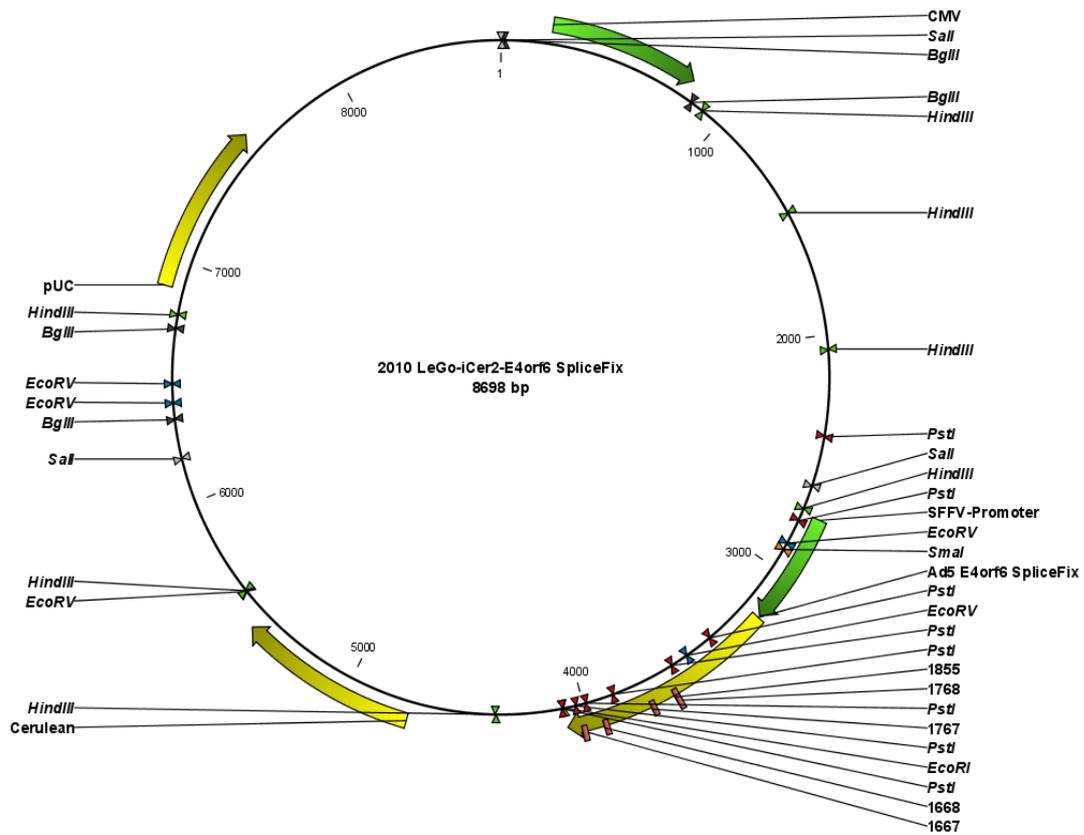


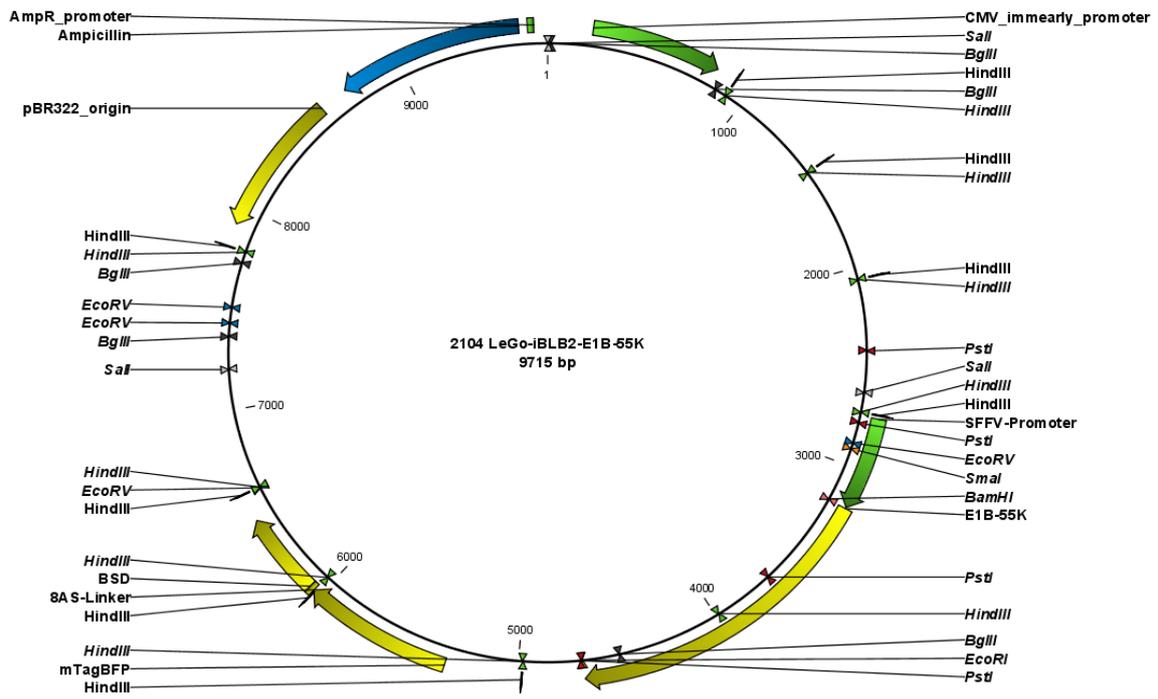


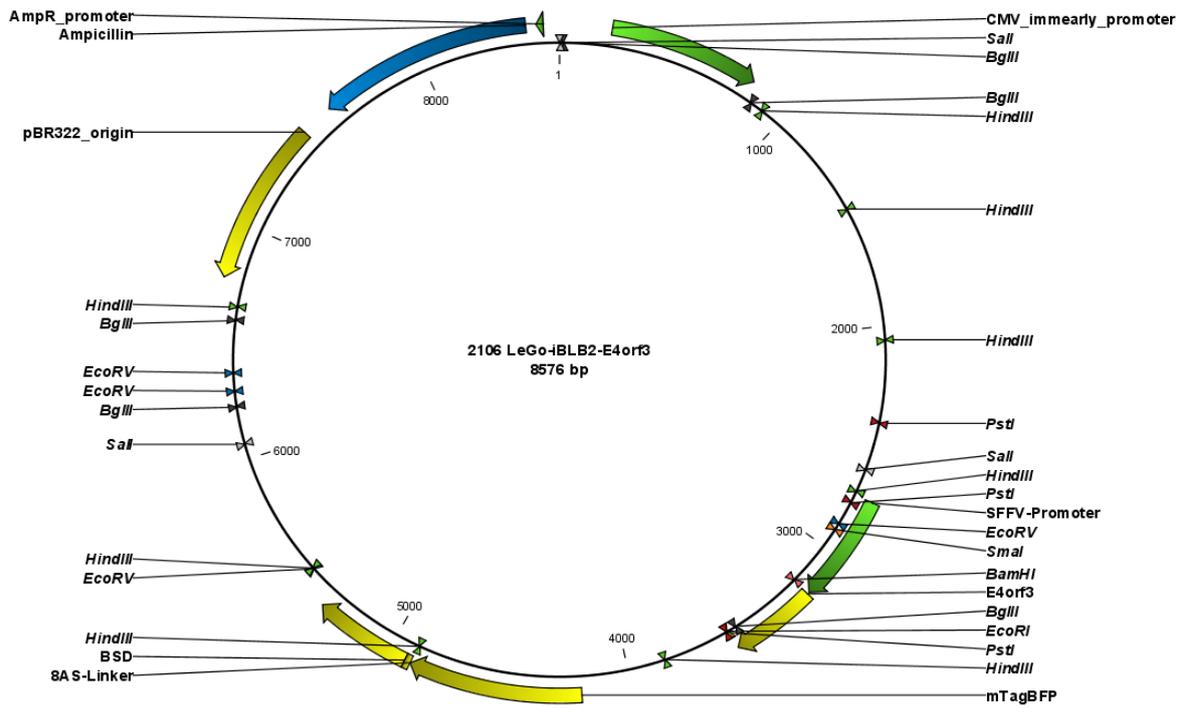


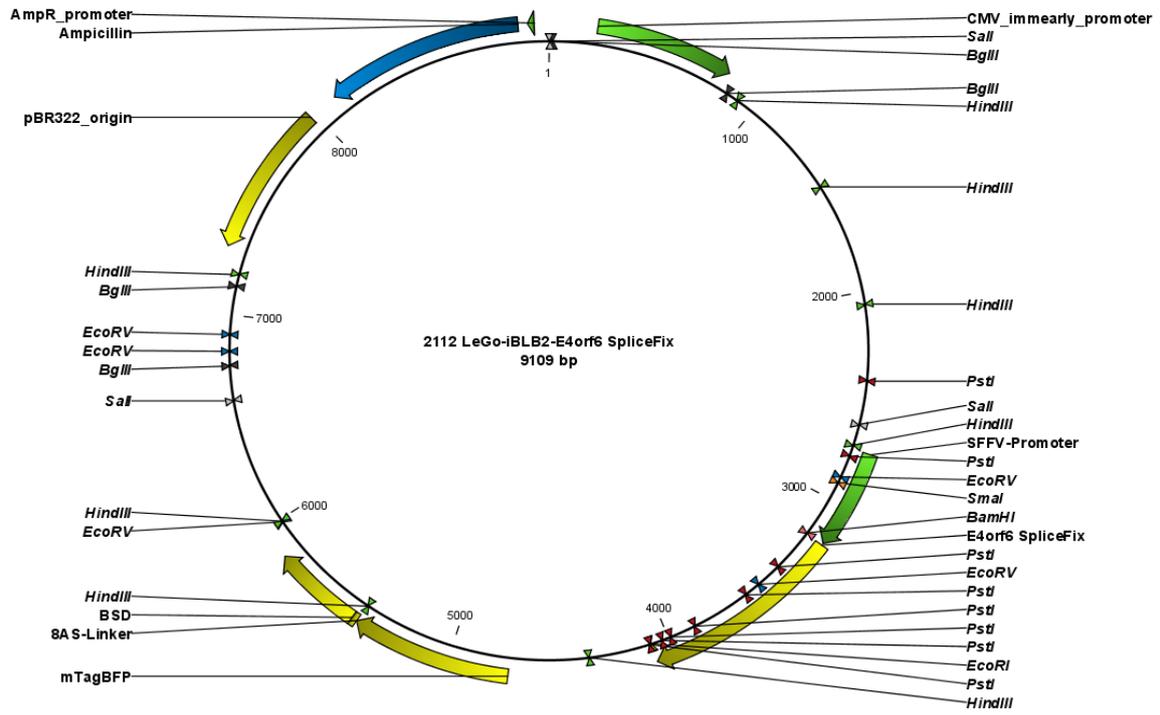












## DANKSAGUNG

*Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Dobner möchte ich mich ganz herzlich für die Möglichkeit bedanken, das interessante Thema dieser Dissertation in der Abteilung Molekulare Virologie des Heinrich-Pette-Instituts bearbeiten zu dürfen. Außerdem sei ihm für seine engagierte Betreuung sowie für die Erstellung des Erstgutachtens gedankt.*

*Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Wolfram Brune für seine Bereitschaft, das Zweitgutachten dieser Dissertation zu übernehmen.*

*Herrn Prof. Dr. Hans Will und Herrn PD Dr. Andreas Pommerening-Röser (Biozentrum Klein Flottbek) sei für ihre Teilnahme an der Disputation in der Funktion der Disputationsgutachter gedankt. Außerdem gilt mein Dank dem Vorsitzenden des Prüfungsausschusses, Herrn Prof. Dr. Alexander Haas (Biozentrum Grindel) sowie allen Fragestellern.*

*Herrn Dr. Timo Sieber möchte ich für die Einarbeitung in das Thema dieser Arbeit sowie für seine Unterstützung bei der Etablierung des lentiviralen Vektorsystems und bei den Transformationsexperimenten an Rattenzellen danken. Darüber hinaus stand er auch in anderen Fragen immer mit Rat und Hilfe zur Verfügung.*

*Frau Dr. Karin Kosulin danke ich für das intensive Korrekturlesen sowie für den Gedankenaustausch zum Thema dieser Arbeit.*

*Bei Herrn Peter Groitl möchte ich mich ebenfalls für seinen Rat und seine Hilfe bei der Entwicklung des lentiviralen Vektorsystems bedanken.*

*Mein Dank gilt darüber hinaus allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Molekulare Virologie für die gute Zusammenarbeit. Vor allem möchte ich allen Kollegen für die Unterstützung bei Arbeiten danken, die ich aufgrund meiner Schwangerschaft aus Sicherheitsgründen nicht selbst durchführen durfte.*

*Herrn PD Dr. Wolfgang Bohn sei für die Bereitstellung einer Probe mesenchymaler Stromazellen gedankt, die eine wesentliche Grundlage dieser Arbeit darstellten.*

*Frau Cordula Grüttner und Herrn Arne Düsedau danke ich für Rat und Hilfe bei den durchflusszytometrischen Analysen dieser Arbeit. Außerdem möchte ich Frau Grüttner für ihre Unterstützung bei der Charakterisierung mesenchymaler Stromazellen danken.*

*Bei Herrn Prof. Dr. Kurt Hecher und seinen Mitarbeitern (Klinik und Poliklinik für Pränatalmedizin, UKE) möchte ich mich für die freundliche Bereitstellung von Fruchtwasserproben anonymer Spenderinnen bedanken.*

*Mein Dank gilt außerdem Frau PD Dr. Claudia Lange (Forschungsabteilung Zell- und Gentherapie, Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation, UKE) für ihre Hilfe bei der Charakterisierung mesenchymaler Stromazellen.*

*Sehr herzlich möchte ich auch dem Tierarzt Herrn Dr. Thilo Spruß (Tierstall der Universität Regensburg) danken, der so freundlich war, den Tumorigenitätstest transformierter Zellklone an Nacktmäusen durchzuführen. Herrn PD Dr. Michael Nevels (Universität Regensburg) sei in diesem Zusammenhang herzlich für die Vorbereitung der zu untersuchenden Zellen gedankt.*

*Herrn Prof. Dr. Karsten Held und Frau Dr. Susanne Kerber (Firma MVZ genteQ, Hamburg) möchte ich für die zytogenetische Untersuchung primärer mesenchymaler Stromazellen danken.*

*Ebenso sei Frau DI Dr. Elisabeth Krömer-Holzinger (Firma labdia Labordiagnostik, Wien) für die umfangreiche zytogenetische Analyse von transformierten Klonen mesenchymaler Stromazellen gedankt.*

*Worte allein reichen nicht aus, um auszudrücken, wie sehr ich Akim, meinen Eltern, meiner Schwester und meinen engen Freunden von ganzem Herzen dafür danke, dass sie mich immer unterstützen, an mich glauben und mir dabei helfen, meine Ziele zu erreichen!*

*Diese Arbeit wurde von der Wilhelm Sander-Stiftung finanziert.*