

Institut für Molekularbiologie
(Tumorforschung)

**Untersuchungen zur Struktur, Lokalisation und Funktion
des zellulären Proteins r-SREC, das mit adenoviralen
E1A-Proteinen interagiert**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereiches

Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur
an der Universität Essen-Duisburg

vorgelegt von

Katja-Patricia Schoppmeyer

aus Paderborn

Mai 2004

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Ergebnisse wurden am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung) der Universität Essen-Duisburg durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Esche
2. Gutachter: Prof. Dr. E. Winterhager

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. B. Oplaka

Tag der mündlichen Prüfung: 08.09.2004

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abkürzungen	IV
1.	Einleitung	1
1.1	Adenoviren	2
1.1.1	Die produktive Infektion	4
1.1.2	Die abortive Infektion	5
1.2	Die Struktur der E1A-Regionen des hoch-onkogenen Serotyps Ad12 und des nicht-onkogenen Serotyps Ad2	6
1.2.1	Die Funktionen der adenoviralen Proteine Ad-E1A _{13S} und Ad-E1A _{12S}	8
1.2.2	Transformation durch Adenoviren und onkogene Determinanten der Adenoviren	10
1.3	r-SREC ein cytoplasmatisch lokalisierter Interaktionspartner von Ad12 E1A-Proteinen	12
1.3.1	Struktur des Zinkfinger-Motivs DHHC	14
1.4	Zielsetzung	16
2.	Material	17
2.1	Chemikalien	17
2.2	Enzyme	19
2.3	Oligonukleotide	20
2.4	Plasmide	21
2.5	Antikörper	22
2.6	Medien, Reagenzien und Materialien für die Zellkultur	23
2.7	Radiochemikalien	23
2.8	Molekulargewichtstandards	24
2.9	Kits und spezielle Reagenzien	24
2.10	Filme, Filter, Membranen und besondere Verbrauchsmaterialien	25
2.11	Spezielle Laborgeräte	25
2.12	Puffer und Lösungen	26
2.13	Bakterienstämme und Hefestämme	32
2.14	Zelllinien	33
3.	Methoden	34
3.1	Allgemeine Methoden	34
3.2	Isolierung und Charakterisierung von Nukleinsäuren	34

3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Mullis et al, 1986)	34
3.2.2	Southern-Blotting (Southern, 1975)	34
3.2.3	Strippen des Southern Blots	35
3.2.4	Isolierung von totaler RNA aus humanen Zelllinien	36
3.2.5	Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	36
3.2.6	Genchip-Assays	36
3.3	Analyse von Proteinen	38
3.3.1	Herstellung von Gesamtzell-Proteinextrakten aus Säugerzellen	38
3.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
3.3.3	Western-Blotting (Harlow und Lane, 1988)	39
3.3.4	Protein/Protein-Interaktionsstudien mittels GST-„Pull-Down“-Assay	40
3.3.5	Protein/Protein-Interaktionsstudien mittels Hefe SOS-„Two-Hybrid“-System	41
3.3.6	Das Hefe SOS-„Two-Hybrid“-System	41
3.4	Zellkultur	46
3.4.1	Transfektion von Eukaryontenzellen durch Metafectene	46
3.4.2	Herstellung einer induzierbaren Zelllinie mittels T-REx-Systems	47
3.4.3	Immunfluoreszenzen	49
3.4.4	TUNEL-Assay	49
3.4.5	AnnexinV/ Propidiumiodid-Färbung	50
4.	Ergebnisse	51
4.1	Etablierung einer HeLa-Zelllinie mit einer durch Tetracyclin induzierbaren r-SREC-Proteinexpression	52
4.2	Konstruktion von Deletionsmutanten des r-SREC-Gens	56
4.3	Charakterisierung der Proteininteraktionsdomänen von Ad12 E1A13S und r-SREC mittels GST-„Pull-Down“-Experimenten	57
4.4	Untersuchungen zur Lokalisation des r-SREC-Proteins	59
4.4.1	Lokalisation von r-SREC-WT und r-SREC-Mutanten in KB- und T-REx-HeLa-Zellen	60
4.4.2	Einfluss adenoviraler E1A-Proteine auf die Lokalisation des r-SREC-Proteins	66
4.4.3	Einfluss von Thapsigargin induzierten ER-Stress auf die Lokalisation des r-SREC-Proteins	69
4.5	Untersuchungen zur putativen Funktion von r-SREC	71
4.6	Identifikation von zellulären Interaktionspartnern des r-SREC Proteins	71

4.6.1	Identifikation von zellulären Interaktionspartnern des r-SREC-Proteins mit Hilfe des Hefe SOS-„Two-Hybrid“-Systems	71
4.6.2	Identifikation von zellulären Interaktionspartnern des r-SREC-Proteins mit Hilfe von Genchip-Analysen	75
4.6.3	Einfluss der Expression des r-SREC-Proteins auf die Apoptose in T-REx-HeLa-Zellen	83
5.	Diskussion	95
5.1	Charakterisierung der Proteininteraktionsdomänen von Ad12 E1A13S und r-SREC mittels GST-„Pull-Down“- Experimenten	96
5.2	Vergleich der Proteinsequenz von r-SREC mit anderer Proteinen, die eine DHHC- und Transmembranomäne besitzen	97
5.3	Lokalisation des r-SREC-Proteins in der Zelle	98
5.4	Die Expression von exogenem r-SREC-Protein induziert Apoptose	99
5.5	Ein Interaktionspartner des r-SREC-Proteins konnte mit Hilfe des Hefe SOS-„Two-Hybrid“-Systems nicht detektiert werden	101
5.6	Erhalt von Hinweisen auf mögliche r-SREC-Funktionen durch Genchip-Analysen.	103
6.	Zusammenfassung und Ausblick	106
7.	Literaturverzeichnis	107
8.	Publikationen	123
9.	Lebenslauf	124
10.	Erklärungen	125

II Abkürzungen

A	Ampere
A.	Aqua
aa	"aminonacid" (Aminosäure)
Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	"American Type Culture Collection"
ATF-2	"Activating Transcription Faktor-2"
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bar	Einheit des Druckes
bidest.	zweifach destilliert
bp	"basepair" (Basenpaar)
Bq	Becquerel; 1 Bq = 1 Zerfall pro Sekunde
BSA	"Bovine Serum Albumin" (Rinder Serum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
cAMP	zyklisches Adenosin-5'-Monophosphat
CAR	Coxsackievirus Adenovirus Rezeptor
CBP	"Cap Binding Protein"
cDNA	zur RNA komplementäre DNA
°C	Grad Celcius
Ci	Curie; 1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Bq
ConA	Concanavalin A
cpm	"counts per minute" (Radioaktive Impulse pro Minute)
CR1-CR3	Conserved Regions (konservierte Regionen der E1A-Region der Adenoviren)
CRE	"cAMP-Responsive-Element"
CREB	"cAMP-Responsive-Element Binding Protein"
Da	Dalton (atomare Masseneinheit; 1 Dalton = $1,66 \times 10^{-24}$ g)
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DHHC	spezielle cysteinreiche Zinkfingerdomäne (Einbuchstabencode)
DEPC	Diethyl Pyrokarbonat

dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMEM	Dulbeccos Modifikation des Mediums nach Eagle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E2F	Transkriptionsfaktor 2
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EOR	"ER overload response"
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F _c	"Fragment crystallizing"
FITC	Flouresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GAP	"GTPase Activating Protein"
GB	Genbank
Grb2	"Growth factor receptor bound protein 2"
GST	Gluthation-S-Transferase
h	Stunde
HEK	"Human Embryo Kidney" (humane embryonale Nierenzellen)
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
HPO	Horseradish-Peroxydase (Meerrettich-Peroxydase)
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-Thiogalactosid
l	Liter
LB	Luria-Bertania
LOH	"Loss Of Heterozygosity"
M	Molarität (mol/l)
MHC	"Major Histocompatibility Complex" (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MEK	"Mitogen Activated Protein Kinase/ERK Kinase"
min	Minute
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>

mol	Mol (Stoffmenge)
mRNA	"messenger RNA" (Boten-RNA)
MYR	Myristilisierungssignal
NP-40	Nonidet P-40
Nr.	Nummer
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
PBS	"Phosphate-Buffered-Saline" (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	"Polymerase Chain Reaction" (Polymerase-Ketten-Reaktion)
pH	pH-Wert ($\text{pH} = -\log_{10} [\text{Protonenkonzentration (mol/l)}]$)
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
pRB	Retinoblastom Protein
PS	Phosphatidylserin
RI α , RII α	Regulatorische Untereinheiten
ream	Reduced Expression Associated with Metastasis
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
<i>R. norvegicus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
r-SREC	"Rat Small Reduced Expression in Cancer"
RT	Reverse Transkriptase
S	Spacer
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOS	"Son-of-Sevenless"
Tab.	Tabelle
TBS	"Tris-Buffered-Saline" (trisgepufferte Salzlösung)
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembranregion
TNF	"Tumor Nekrose Faktor"
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	Terminal Deoxynukleotidyl Transferase dUTP Nick End Labelling
U	Unit (Enzym-Aktivitätseinheit; 1 U = 1 mol/min)
UPR	"unfolded protein response"

V	Volt
<i>v-src</i>	"Virus Sarcoma"
VT	Versen-Trypsin
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung g ($1 \text{ x g} = 9,81 \text{ x m/s}^2$)
z. B.	zum Beispiel

In dieser Arbeit benutzte Vorsätze zur Angabe der Zehnerpotenz, mit der die Maßeinheit zu multiplizieren ist:

T	Tera	= 10^{12}
G	Giga	= 10^9
k	Kilo	= 10^3
c	Zenti	= 10^{-2}
m	Milli	= 10^{-3}
μ	Mikro	= 10^{-6}
p	Piko	= 10^{-12}

1. Einleitung

Viren fehlt sowohl eine eigene Proteinbiosynthesemaschinerie, als auch energiebildende Stoffwechselsysteme, daher sind sie bei der Replikation auf die Infektion lebender Zellen angewiesen, deren makromolekulare Synthesen sie zugunsten der Expression ihrer Genprodukte modifizieren und nutzen. Die Umprogrammierung einer Reihe von zellulären Prozessen durch virale Proteine kann, wenn auch selten, zur Transformation der infizierten Zelle führen. Bei transduzierten Retroviren beispielsweise ist die Onkogenität unter anderem darauf zurückzuführen, dass zuvor in das Virusgenom aufgenommene wichtige zelluläre Gene (Protoonkogene), wie z. B. *c-myc* oder *c-jun* zudem oft mutiert (dann Onkogene), mit dem Virusgenom in die Zelle eingebracht und überexprimiert werden (als Übersicht siehe Nevins und Vogt, 1996).

DNA-Tumoviren, beispielsweise Adenoviren oder Polyomaviren exprimieren dagegen virale Onkogene, die mit zellulären Faktoren wie z. B. dem Retinoblastom-Suszeptibilitätsprotein pRB oder dem Tumorsuppressorprotein p53 interagieren (als Übersicht siehe Gallimore und Turnell, 2001, Frisch und Mymryk, 2002). Sie sind somit in der Lage, z. B. ruhende Zellen (G_0) zur Replikation anzuregen, was eine Voraussetzung für die Replikation des viralen DNA-Genoms darstellt.

Adenovirus-Wirtszell-Systeme werden seit der Entdeckung der tumorigen Eigenschaften von Adenoviren als Modellsystem, für die virusinduzierte Onkogenese verwendet. Dies hatte zur Folge, dass heute eine Vielzahl von Mechanismen die an der Transformation eukaryontischer Zellen sowie deren maligner Entartung beteiligt sind, durch die Untersuchung von Adenovirus-Wirtszell-Systemen und der Folgen des Eingriffs viraler Proteine in zelluläre Abläufe aufgeklärt wurden.

1.1 Adenoviren

Adenoviren zählen zur Familie der Adenoviridae, die sich in die Gattungen Aviadenovirus (Vogel-Adenoviren) und Mastadenovirus (Säuger-Adenoviren) gliedert (Norrby *et al.*, 1976). Rowe und Mitarbeitern isolierten 1953 erstmals humanpathogene Adenoviren aus chirurgisch entferntem Rachenmandelgewebe. Adenovirusinfektionen führen beim Menschen zu schwachen Infektionen epithelialer Zellen des Respirationstraktes, des Gastrointestinaltraktes, der Harnwege oder der Bindehaut des Auges (als Übersicht siehe Horwitz, 1990).

Adenoviren gehören zur Gruppe der DNA Tumorviren. Es wurden bisher insgesamt mehr als 45 humanpathogene Adenovirus Serotypen beschrieben, die anhand unterschiedlicher Kriterien wie z. B. DNA-Sequenzhomologien, Haemagglutinations-Reaktionen mit Ratten- und Rhesusaffenerythrocyten, ihrer Onkogenität in Nagern und der Polypeptid-Zusammensetzung des Virions, in sechs Subgenera (A-F) eingeteilt werden (als Übersicht Baily und Mautner, 1994).

Die Morphologie der Adenoviren ist gut charakterisiert (Stewart *et al.*, 1993). Das Virion des Adenovirus ist ikosaedrisch geformt, nicht membranumschlossen und besitzt einen Durchmesser von 70–90 nm. Es beinhaltet das Virusgenom (36–38 kbp) in Form eines linearen doppelsträngigen DNA-Moleküls (als Übersicht siehe Flint und Broker, 1981). Das Capsid des Virions setzt sich aus 240 Hexoncapsomeren und 12 Pentacapsomeren, bestehend aus Penton-Basen und der Fiber-Protein, zusammen (als Übersicht siehe Philipson, 1983; Russel, 2000) (s. Abb. 1). Die an der Oberfläche des Pentoncapsomers verankerten Fiber-Proteine sind für die Anheftung des Virus spezifische Rezeptoren verantwortlich. Die meisten Vertreter der Adenovirus-Subgenera A, C, D, E und F nutzen das sog. Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR)-Protein als Fiber-Rezeptor (Roelvink *et al.*, 1998). Das CAR-Protein ist als Komponente der sog. „tight junctions“, die für die Verbindung benachbarter Einzelzellen im Zellverband verantwortlich sind (Cohen *et al.*, 2001). Der Eintritt des Virions in die Zelle erfolgt endozytotisch als Folge der Interaktion der Penton-Proteine mit einem Rezeptor der α V-Integrin-Rezeptor Familie. Diese Interaktion bewirkt eine Abstoßung der Fiber-Proteine und das Eindringen des Virions in frühe Endosomen über sog. „Clathrin coated pits“ (als Übersicht siehe Cullan, 2001).

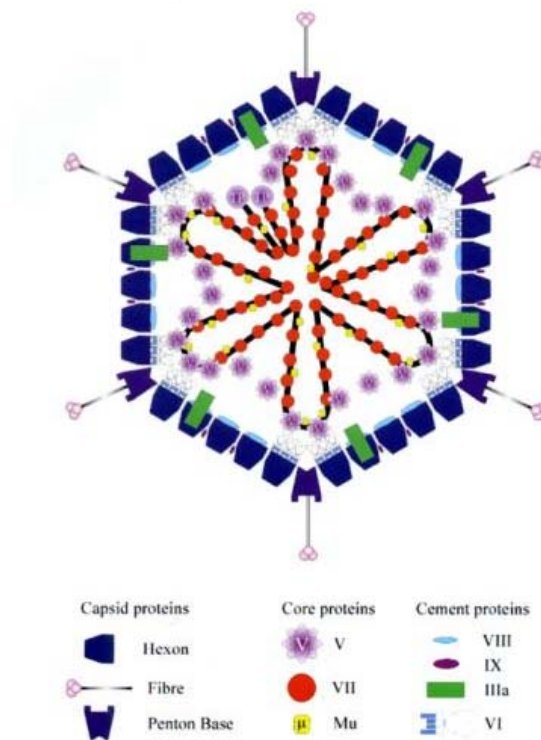


Abb. 1: Struktur eines Adenovirus. Das Capsid des Adenovirus ist aus den drei Capsid-bildenden Proteinen Hexoncaptomeren, Fiber-Proteinen und Penton-Basen aufgebaut. Die Kernproteine V, VII und Mu interagieren mit der DNA des Virus. Die Proteine VIII, IX, IIIa und VI dienen der Stabilität des Capsids. (nach Russel, 2000)

Der Abfall des pH-Wertes in den Endosomen führt zu einer Konformationsänderung des Virions, wodurch die endosomale Membran zerstört wird, und die teilweise enthüllten Virionen freigesetzt werden (Greber *et al.*, 1993). Nach Eintritt in das Cytoplasma gelangen diese Virionen, vermutlich durch eine Interaktion der Hexon-Captomere mit den Mikrotubuli, zu den Kernporen (Pastan *et al.*, 1987). Der vollständige Zerfall der Virushülle und der Import der mit viralen Proteinen komplexierten Virus-DNA in den Zellkern wird durch die Assoziation des Virus an die Kernmembran bewirkt (Greber *et al.*, 1997). Trotman und Mitarbeiter zeigten im Jahr 2001, dass das sog. „Nuclear Pore Complex“ Protein CAN/Nup24 des Kernporenkomplexes als Interaktionsprotein für Ad2-Capside fungiert. Für die Freisetzung der Virus DNA ist außerdem die Interaktion von Histon-1 und H1-Importfaktoren mit dem Viruskapsid wichtig (Trotman *et al.*, 2001).

Nach Eintritt in die Wirtszelle werden bei humanpathogenen Adenoviren zwei mögliche Formen des Infektionsverlaufes unterschieden: die **produktive Infektion** permissiver, humaner Zellen und die **abortive Infektion** nicht-permissiver Zellen (z. B. Nagerzellen).

1.1.1 Die produktive Infektion

Die produktive Infektion führt zur Replikation der viralen DNA, des Zusammenbaus des Virions und letztendlich zur Lyse der Wirtszelle und der Freisetzung von Virusnachkommen. Nach der Infektion gelangt das Virusgenom in den Zellkern und die Expression der viralen Gene erfolgt, die nach dem Zeitpunkt ihrer Expression in frühe (E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4) und späte (L1, L2, L3, L4, L5) Gene gegliedert werden (Broker *et al.*, 1984; s. Abb. 2).

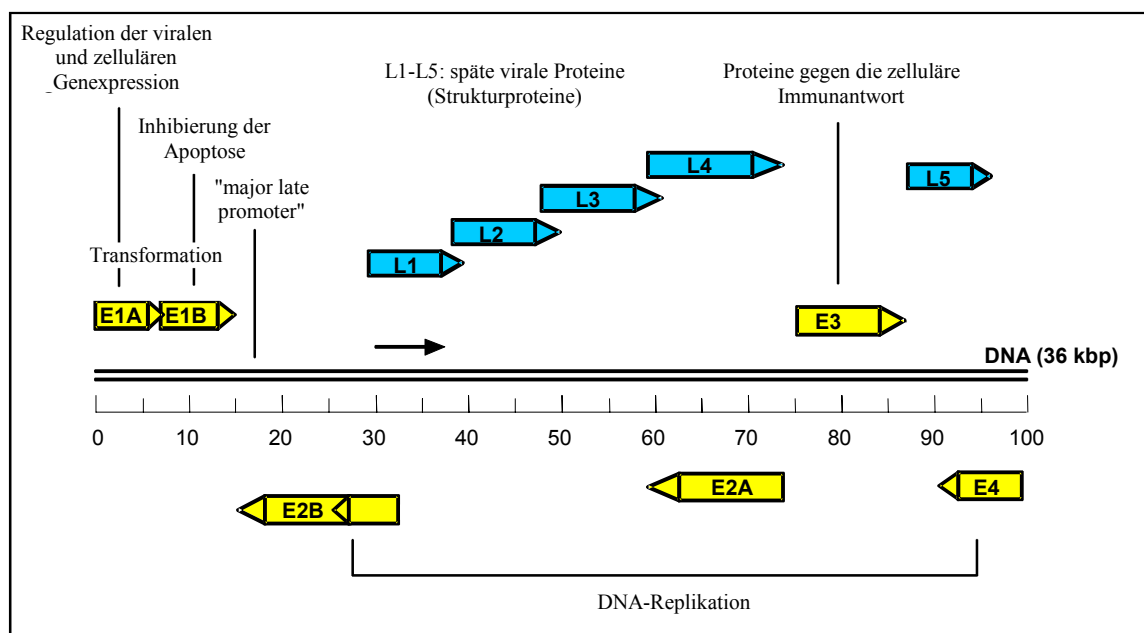


Abb. 2: Schematische Darstellung der Organisation des Genoms humanpathogener Adenoviren (nach Watson *et al.*, 1987). Das lineare doppelsträngige DNA-Molekül der Adenoviren wird in „map units“ (1-100) unterteilt. Die Transkriptionseinheiten gliedern sich in frühe (E = early; E1-E4) und späte (L = late;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

Die Genprodukte der frühen Regionen E1-E4 greifen in virale und zelluläre Abläufe ein, um eine für die Virusvermehrung geeignete Umgebung zu schaffen. Die Proteine der E1-Region werden in die distinkten Transkriptionseinheiten E1A und E1B unterteilt. Die E1A-Proteine regulieren hierbei im Verlauf des lytischen Entwicklungszyklus die Expression der viralen Gene, sowie die Transkription einer Vielzahl zellulärer Gene (als Übersicht siehe Brockmann und Esche, 1995; Gallimore und Turnel, 2001; Frisch und Mymryk, 2002). Die E1B-Region kodiert für zwei Proteine (19 kDa, 55 kDa). Das 55 kDa Protein ist unter anderem für die Akkumulation, die Stabilisierung, den Transport und die selektive Expression viraler mRNA verantwortlich (Pilder *et al.*, 1986; Zhang *et al.*, 1995; Gabler *et al.*, 1998). Im

lytischen Zyklus wird die TNF α -induzierte Apoptose durch E1B inhibiert (Gooding *et al.*, 1991; White *et al.*, 1992). Die Region E2 kodiert für Proteine, die für die Virusreplikation essenziell sind. Hierzu zählen eine virale DNA-Polymerase, ein DNA-Bindeprotein, und das terminale Protein (Sussenbach und van der Vliet, 1983). Die Produkte der E3-Region wirken der Immunantwort des Wirtsorganismus entgegen, indem sie unter anderem die Translokation der MHC-Klasse-I-Moleküle an die Zellmembran (Burgert *et al.*, 1987) und die TNF-vermittelte Zellyse verhindern (Gooding *et al.*, 1988). Proteine, die an der Regulation der viralen und der zellulären Genexpression, sowie dem Zusammenbau der Viruspartikel beteiligt sind, werden durch die E4-Region kodiert. Sie induzieren in Kooperation mit den E1B-Proteinen die selektive Akkumulation viraler RNA (als Übersicht Shenk, 1996).

Die späte Phase des viralen Entwicklungszyklus beginnt mit der Replikation des Virusgenoms, je nach Adenovirus Serotyp etwa 6-8 h nach der Infektion der Zelle. Nach Beginn dieser späten Phase werden aus einer nukleären Vorläufer-RNA durch alternatives Spleißen mehr als 20 späte mRNAs synthetisiert, die in fünf Familien (L1-L5) eingeteilt werden (Abb. 2) und für virale Strukturproteine (z. B. Capsomere, Fibern) oder deren Vorläufer (als Übersicht siehe Flint und Broker, 1981) kodieren. Diese Strukturproteine werden anschließend in den Zellkern transportiert, in dem sie zu infektiösen Virionen zusammengesetzt werden (Horwitz *et al.*, 1969). Der produktive Zyklus endet mit der Lyse der Wirtszelle und der Freisetzung infektiöser Virionen (Tooze, 1981). Die Zellyse wird unter der Beteiligung des sog. „Adenovirus Death Protein“ (ADP), einem ca. 11 kDa großen Protein, das von der E3-Region kodiert wird (siehe z. B. Tollefson *et al.*, 1996), induziert.

1.1.2 Die abortive Infektion

Bei der Infektion nicht-permissiver Zellen (z. B. Nagerzellen) durchlaufen humanpathogene Adenoviren einen abortiven Zyklus, in dessen Verlauf keine infektiösen Virionen gebildet werden (Doerfler, 1969). Die Infektion der Wirtszelle und die Expression der frühen Gene (E1-E4) erfolgt analog zur produktiven Infektion. Eine Virusvermehrung sowie die Expression der späten Regionen des Virusgenoms und die damit verbundene Bildung viraler Strukturproteine findet jedoch nicht statt (Esche *et al.*, 1979; Esche und Siegmann, 1982).

Die abortive Infektion führt in $1 \cdot 10^{-6}$ bis $1 \cdot 10^{-5}$ Fällen zur Transformation der infizierten Zelle (van der Eb und Bernhards, 1984). Hierbei integriert das virale Genom vollständig oder partiell in das Genom der Wirtszelle. Werden solche *in vitro* transformierten Zellen in immundefiziente Nager inokuliert, wachsen sie zu Tumoren aus. In

immundefizienten Nagern sind alle Ad-Serotypen in der Lage ein Tumorwachstum zu induzieren. In immunkompetenten Tieren jedoch, kann ein Tumorwachstum nur von den onkogenen Serotypen induziert werden. Daher werden die Adenoviren aufgrund ihrer unterschiedlichen Onkogenität in immunkompetenten Nagern in onkogene (z. B. Ad12, Ad31) und nicht-onkogene Serotypen (z. B. Ad2, Ad5) eingeteilt. Eine weitere Unterteilung der onkogenen Serotypen findet an Hand des Zeitraums bis zum Auftreten von Tumoren und der Häufigkeit, mit der die inokulierten Zellen in Nagern zu Tumoren auswachsen, in hoch-onkogene (z. B. Ad12, Ad31) und schwach-onkogene (z. B. Ad3 und Ad7) Adenoviren statt (Wadell, 1984). Für die Transformation nicht permissiver Nagerzellen durch humanpathogene Adenoviren ist die konstitutive Expression der Genprodukte der E1A- und E1B-Region notwendig (van der Eb *et al.*, 1977; van der Eb und Bernhards, 1984). Bernhards und Mitarbeiter konnten 1983 durch Untersuchungen an Ad12/Ad2-Adenovirus-Chimären zeigen, dass das onkogene Potential der Adenoviren in immunkompetenten Nagern ausschließlich durch die Herkunft der E1A-Region bestimmt wird. Die unterschiedliche Tumorigenität der einzelnen Adenovirus-Serotypen ist somit in funktionellen Unterschieden der jeweiligen E1A-Region begründet.

1.2 Die Struktur der E1A-Regionen des hoch-onkogenen Serotyps Ad12 und des nicht-onkogenen Serotyps Ad2

Der Vergleich der Struktur von hoch-onkogenen Serotypen mit nicht-onkogenen Serotypen kann Aufschluss über mögliche onkogenen Determinanten geben. In Abb. 3 ist der schematische Vergleich der E1A-Regionen des hoch-onkogenen Serotyps Ad12 und des nicht-onkogenen Serotyps Ad2 dargestellt. Durch alternatives Spleißen entstehen aus der hnRNA der E1A-Region des hoch-onkogenen Ad12 sechs verschiedene mRNAs, die entsprechend ihres Sedimentationskoeffizienten als 13S, 12S, 11S, 10S, 9,5S und 9S bezeichnet werden und für fünf Proteine Ad12-E1A_{13S}, Ad12-E1A_{12S}, Ad12-E1A_{10S/11S}, Ad12-E1A_{9,5S}, Ad12-E1A_{9S} kodieren (s. Abb. 3; Perricaudet *et al.*, 1980; Sawada und Fujinga, 1980; Brockmann *et al.*, 1990). Die 5'- und 3'-Termini der mRNAs sind identisch, die mRNAs unterscheiden sich jedoch in ihrer Größe, da während der Prozessierung der Vorläufer-RNA unterschiedlich große Introns eliminiert werden.

Die beiden Proteine Ad12-E1A_{13S} und Ad12-E1A_{12S} bestehen aus 266 bzw. 235 Aminosäuren und sind die beiden hauptsächlichen Genprodukte. Das Leseraster der beiden Proteine ist identisch, als Folge des RNA-Spleißens fehlt dem Ad12-E1A_{12S}-Protein jedoch

die interne Region von nt 976 bis nt 1069 (s. Abb. 3; Brockmann und Esche, 1995). Diese Region umfasst eine der drei in alle Serotypen hoch konservierten Regionen (in Abb. 3 als schwarzer Balken gekennzeichnet) (Kimelmann *et al.*, 1985), die als CR1-CR3 bezeichnet werden (als Übersicht siehe Brockmann und Esche, 1995). Zwischen der konservierten Region 2 und der konservierten Region 3 von Ad12-E1A liegt der sog. Spacer, eine 20 Aminosäuren umfassende Sequenz, die in der E1A-Region nicht-onkogener Adenoviren (z. B. Ad2/5) fehlt. Eine ähnliche etwas längere Sequenz findet sich in den E1A-Proteinen des *Simian virus 7* (SA7). Bei dem schwach-onkogenen Ad3 ist ein leicht verkürzter Spacer zu finden (Telling und Williams, 1994). Durch den Einsatz von Spacermutanten wurde der Spacer im Tierversuch als eine der onkogenen Determinanten in Ad12-E1A identifiziert (Jelinek *et al.*, 1994; Telling und Williams, 1994). Aufgrund von Spleißvorgängen kommt es bei den 11S-, 10S-, 9,5S-, und 9S-mRNAs zu einer Änderung des Leserasters nach der Aminosäure 29. Von diesen mRNAs werden die Proteine Ad12-E1A_{10S/11S} (106 aa), Ad12-E1A_{9,5S} (52 aa) bzw. Ad12-E1A_{9S} (53 aa) translatiert. Diese Proteine beinhalten keine der konservierten Regionen (CR1-CR3) und zeigen, mit Ausnahme des N-terminalen Bereiches, keinerlei Sequenzhomologien zu den Proteinen Ad12-E1A_{13S} und Ad12-E1A_{12S} (Brockmann und Esche 1995). Aufgrund eines Stopkodons vor der zweiten Spleißstelle liefern die 11S- und 10S-mRNAs ein identisches Protein. Die Struktur der 9S-mRNA ist zwischen allen Adenovirus-Serotypen über weite Bereiche hoch konserviert (Perricaudet *et al.*, 1980).

Die E1A-Region des nicht-onkogenen Ad2 (s. Abb. 3) liefert durch alternatives Spleißen der hnRNA fünf unterschiedliche mRNAs (13S, 12S, 11S, 10S, 9S; Stephens und Harlow, 1987; Ulfendahl *et al.*, 1987), die für fünf verschieden große Proteine mit 289 (Ad2-E1A_{13S}), 243 (Ad2-E1A_{12S}), 217 (Ad2-E1A_{11S}), 171 (Ad2-E1A_{10S}) und 55 (Ad2-E1A_{9S}) Aminosäuren kodieren. Im Unterschied zu Ad12-E1A kommt es bei Ad2-E1A lediglich im Fall des Ad2-E1A_{9S}-Proteins zu einer Leserasterverschiebung. Das Leseraster der übrigen Proteine ist identisch. Sie unterscheiden sich nur durch das Fehlen einzelner konservierter Regionen (Stephens und Harlow, 1987; Ulfendahl *et al.*, 1987).

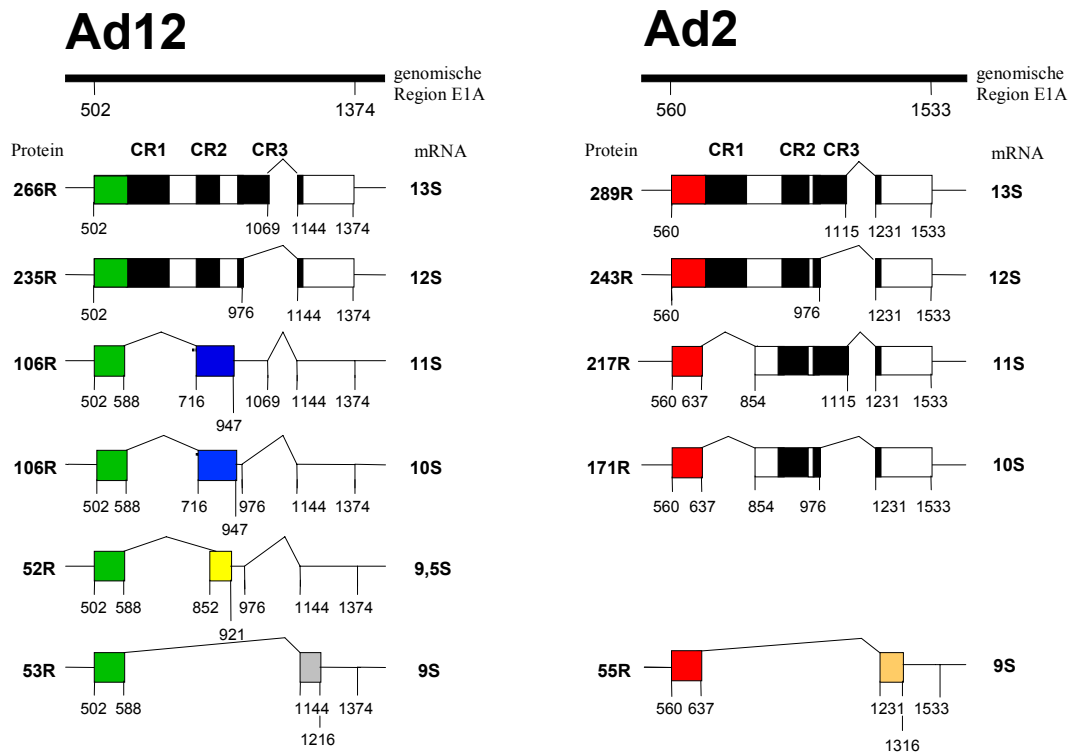


Abb. 3: Vergleich der Struktur der mRNAs und davon abgeleiteter Proteine der E1A-Regionen des hoch-onkogenen Ad12 und des nicht-onkogenen Ad2. Die Rechtecke bezeichnen die von den unterschiedlichen mRNAs translatierten Proteine. Die schwarzen Rechtecke stellen die zwischen Ad12 und Ad2 konservierten Regionen 1 bis 3 (CR1-CR3) dar. Die Zahlen unter den Linien geben die Position der Nucleotide im adenoviralen Genom an. Sie bezeichnen die Lage des gemeinsamen Startkodons, der Spleißstellen und des Stopkodons. Die farbigen Rechtecke weisen auf unterschiedliche Leserahmen innerhalb eines Serotyps hin. (R) Aminosäurerest; (S) Svedberg-Einheit (nach Brockmann und Esche, 1995).

1.2.1 Die Funktionen der adenoviralen Proteine Ad-E1A_{13S} und Ad-E1A_{12S}

Ferguson und Mitarbeiter konnten 1985 zeigen, dass E1A-Proteine keine intrinsische sequenzspezifische DNA-Bindeaktivität besitzen, sondern dass die Interaktion mit zellulären Faktoren für ihre regulatorischen Funktionen verantwortlich ist. Die Transkription zellulärer und viraler Gene zu regulieren, liegt bei E1A-Proteinen darin begründet, dass E1A-Proteine mit einer Reihe von Proteinen wie zellulären Transkriptionsfaktoren (z. B. ATF-2), Koaktivatoren (p300/CBP), Korepressoren (CtBP), Chromatin modulierenden Faktoren (SWI/SNF) oder Proteinen der generellen Transkriptionsmaschinerie und Mediator-Komplexen (TBP, TAFs, hSUR2) interagieren (Bayley und Mymryk, 1994; Mymryk und Smith 1997; Boyer *et al.*, 1999; als Übersicht siehe Gallimore und Turnell, 2001; siehe auch Abb. 4).

Die CR3-Region von E1A_{13S} interagiert mit generellen Faktoren und fungiert selbst als Zinkfinger-Transaktivierungsdomäne (Jones 1995; als Übersicht siehe Brockmann und Esche 1995; Gallimore und Turnell, 2001). Das transaktivierende Potential der CR3-Region

korreliert zudem mit der Fähigkeit von E1A an hSUR, einer Komponente eines transkriptionellen Mediatorkomplexes, zu binden (Boyer *et al.*, 1999). Neben der CR3-Region stellen der nicht konservierte N-Terminus, CR1- und CR2-Region, sowie das Exon 2, dass die Interaktionsdomäne für den zellulären Repressor CtBP beinhaltet, weitere Interaktions- und Aktivierungsdomänen dar.

Die Regulation durch E1A beschränkt sich jedoch nicht auf die virale Genexpression, es werden eine Vielzahl zellulärer Gene durch E1A reguliert. E1A ist beispielsweise in der Lage, die Transkription von *c-myc*, *c-jun* oder β -Tubulin zu aktivieren. Durch die physikalische Interaktion von E1A mit DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren wie *c-jun* und ATF-2 werden die E1A-Proteine an die entsprechenden Zielpromotoren rekrutiert (Liu und Green, 1990). Diese Interaktion bewirkt z. B. die transkriptionelle Aktivierung des *c-jun*-Promotors. *C-jun* ist an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse, wie z. B. der Differenzierung oder der Proliferation, beteiligt (Angel und Karin, 1991). Die erhöhte Expression von *c-jun* durch E1A im lytischen Infektionszyklus ist wahrscheinlich essentiell, da *c-jun* in Signalkaskaden eingebunden ist, die arretierten Zellen den Wiedereintritt in den Zellzyklus erlauben.

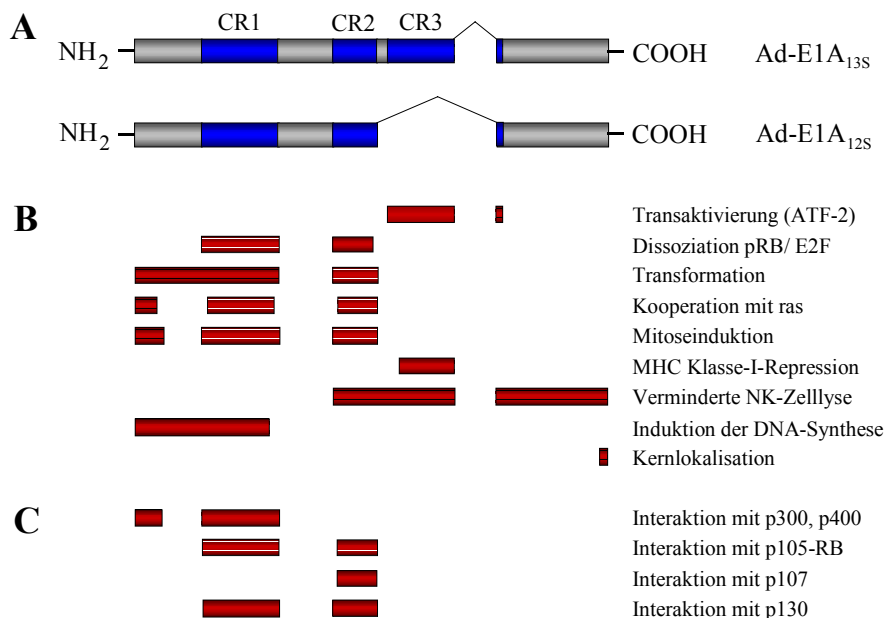


Abb. 4: Darstellung der E1A-Proteine, ihrer funktionellen Domänen und der für die physikalische Interaktion mit zellulären Faktoren essentiellen Regionen. (A) Die Proteine Ad-E1A_{13S} und Ad-E1A_{12S} sind als Rechtecke dargestellt. Die konservierten Regionen CR1-CR3 sind als schwarze Rechteckedargestellt. **(B)** Regionen, die funktionelle Domänen der E1A-Proteine repräsentieren **(C)** Rechtecke symbolisieren Bereiche der E1A-Proteine, die für die physikalische Interaktion mit einigen ausgewählten zellulären Faktoren von essentieller Bedeutung sind.

Eine zweite Möglichkeit, wie E1A-Proteine in den Zellzyklus eingreifen, ist die Aktivierung der E2F-abhängigen Genexpression zellzyklusrelevanter Gene (Ikeda und Nevins, 1993). Durch die Interaktion von CR1 und CR2 mit pRB werden transkriptionsaktive E2F-Proteine aus dem inhibitorischen Komplex mit pRB freigesetzt und initiieren so z. B. die Expression der Gene der Dihydrofolatreduktase oder der Thyminkinase (siehe auch Abschnitt 1.2.2., Whyte *et al.*, 1988A). E1A-Proteine sind außerdem in der Lage, repressorisch auf die Genexpression einzuwirken, wie beispielsweise auf die Expression der Gene, die für Insulin, Fibronectin oder Kollagen kodieren (als Übersicht siehe Brockmann und Esche, 1995). Sie nehmen ebenfalls Einfluss auf die p53-abhängige Aktivierung von Ziel promotoren. Im Falle von p53 führt die Interaktion des Ad12E1A_{13S}-Proteins mit den zellulären Co-Aktivatoren p300/CBP zur Dissoziation der Koaktivatoren aus promotorgebundenen p53-Transkriptionsfaktorkomplexen (Avantaggiati *et al.*, 1997; Lill *et al.*, 1997).

Die E1A-Proteine sind vor allem im Zellkern, sowie in geringer Konzentration im Cytoplasma lokalisiert. Die Lokalisation wird durch die Acetylierung des Lysinrestes 239 beeinflusst. Diese Acetylierung führt zu einer Anreicherung von E1A im Cytoplasma, da die Bindeaffinität von E1A_{12S} zu Importin- α 3 deutlich reduziert ist (Madison *et al.*, 2002). Zu den wenigen im Cytoplasma lokalisierten E1A Interaktionspartnern gehören Sug1 und S4, Komponenten der Proteasomen (die wie E1A, auch im Kern vorliegen; Turnell *et al.*, 2000) regulatorische Untereinheit RII α der Protein Kinase A (Fax *et al.*, 2001) und RACK1 (Sang *et al.*, 2001). Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass Sprouty, ein Inhibitor des Ras-Raf-MAP-Kinase-Signalwegs einen weiteren cytoplasmatisch lokalisierten Interaktionspartner von E1A darstellt.

1.2.2 Transformation durch Adenoviren und onkogene Determinanten der Adenoviren

Wie bereits beschrieben, sind alle bisher bekannten humanpathogenen Adenovirus-Serotypen in der Lage, nicht-permissive Zellen zu transformieren und ein Tumorwachstum in immundefizienten Nagern (z. B. Nacktmäusen) zu induzieren (als Übersicht siehe Williams *et al.*, 1995; siehe auch 1.1.2). Der Prozess der zellulären Transformation durch adenovirale Genprodukte ist eine Folge der konstitutiven Expression der E1A- und E1B-Proteine. Die Proteine der E1A-Region bewirken hierbei zunächst die Immortalisierung der Zelle (Houweling *et al.*, 1980; Ruley, 1983). Die Genprodukte der E1B-Region dienen der Ausbildung des vollständig transformierten Phänotyps, hauptsächlich durch Inhibition der E1A-induzierten Apoptose (als Übersicht siehe Whyte, 1995), haben jedoch selbst keine

transformierenden Eigenschaften (van den Elsen *et al.*, 1983). Merkmale der vollständigen Transformation sind z. B. die Aufhebung der Kontaktinhibition, die morphologische Umgestaltung der Zelle und die Fähigkeit, unabhängig von Verankerungsflächen wachsen zu können (Jochemsen *et al.*, 1982; Byrd *et al.*, 1988).

Eine wichtige Funktion der E1A-Proteine ist die Induktion des Zellzyklus während der produktiven Infektion, da hierdurch die Bereitstellung essentieller Bausteine für die Virusreplikation durch die Zelle gewährleistet wird. Da in nicht-permissiven Zellen keine Virusreplikation stattfindet, die Zelle jedoch kontinuierlich im Zellzyklus gehalten wird, kann deren Infektion in seltenen Fällen zu einer Immortalisierung führen. Dieser Vorgang der Immortalisierung primärer Zellen durch Genprodukte der E1A-Region ist zu einem großen Teil das Resultat der E1A-abhängigen Freisetzung von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie aus inhibitorischen Komplexen mit pRB (Whyte *et al.*, 1988A). So freigesetztes aktives E2F trägt zusammen mit dem zellulären Faktor DP-1 als Heterodimer zur Aktivierung zahlreicher, für das Durchlaufen der S-Phase notwendiger Gene, z. B. der Dihydrofolatreduktase, der Thymidinkinase, von *c-myc* oder Zyklin-E bei (Moran, 1994; Slansky und Farnham, 1996; als Übersicht siehe Zhang und Dean, 2001). Die Bindung von pRB durch E1A erfolgt über die konservierten Regionen 1 und 2 (CR1, CR2) und hat die Dissoziation des pRB/E2F-Komplexes zur Folge.

Eine wichtige Rolle bei der Immortalisierung und der Transformation primärer Zellen. spielt die Interaktion der E1A-Proteinen Ad-E1A_{13S} und Ad-E1A_{12S} mit dem nukleären Phosphoprotein p300 sowie seinem Homolog CBP. Sie sind in der Lage an den N-Terminus und die konservierte Region eins zu binden (s. Abb. 4). In Transformationsstudien konnte gezeigt werden, dass sich die ektopische Überexpression von p300 oder CBP inhibierend auf die Transformation durch E1A auswirkt (Smits *et al.*, 1996). Koli und Mitarbeiter zeigten zudem 2001, dass p300 eine entscheidende Funktion beim Übergang der Zelle von der G₁-in die S-Phase ausübt. Die Interaktion von E1A mit einem zellulären Komplex, bestehend aus p400 und TRRAP/PAF400 ist für die Transformation ebenfalls von entscheidender Bedeutung. E1A-Mutanten, die nicht an p400 binden, sind nicht mehr in der Lage primäre Zellen zu transformieren (Fuchs *et al.*, 2001). Neben der Expression der E1A-Region ist zur Transformation einer Zelle die konstitutive Expression der E1B-Region oder die eines anderen kooperierenden Onkogens bzw. Protoonkogens, wie z. B. der aktiven Form des Ras-Proteins (Byrd *et al.*, 1988) oder Bcl-2 (Sabbatini *et al.*, 1995), essentiell. Die E1B-Region von Ad12 kodiert für ein 55 kDa und ein 19 kDa grosses Protein. Eine im Zuge der Transformation essentielle Funktion von E1B ist die Inhibierung der p53-vermittelten

Apoptose (Sarnow *et al.*, 1982), hervorgerufen durch die Expression der E1A-Proteine. E1A induziert die Stabilisierung des Tumorsuppressorgens p53 (Debbas und White, 1993). Außerdem wird vermutet, dass es die p300-abhängige Degradation von p53 durch den negativen Regulator MDM2 verhindert (Grossman *et al.*, 1998). Die Ursachen der unterschiedlichen Onkogenität der einzelnen Adenovirus-Serotypen in immunkompetenten Tieren sind bis heute nicht vollständig geklärt.

E1A nimmt Einfluss auf eine Vielzahl von Signalwegen, die in die Immunregulation involviert sind, beispielsweise durch Repression der MHC-Klasse-I-Expression. Die Fähigkeit einiger Ad-Serotypen die transfizierten Zellen gegen die Eliminierung durch das Immunsystem des Wirtsorganismus zu schützen, ist von großer Bedeutung für die Onkogenität von Adenoviren. Es wurde gezeigt, dass die Tumorigenität der Adenoviren unter anderem auf einen 20 Aminosäuren umfassenden Spacer zurückzuführen ist. Dieser liegt bei dem hoch-onkogenen Adenovirus Serotyp 12 zwischen der CR2 und CR3 und ist hingegen bei dem nicht-onkogenen Serotyp Ad2 nicht vorhanden (s. Abb. 3) (Jelinek *et al.*, 1994; Telling und Williams, 1994). Durch Williams und Mitarbeiter wurde 1995 gezeigt, dass die Länge dieses Spacers mit dem onkogenen Potential der Viren korreliert. Das erhöhte onkogene Potential von Ad12- gegenüber Ad2/5-transformierten Zellen korreliert außerdem mit einer reduzierten Expression von Molekülen des MHC-Klasse-I auf der Oberfläche der transformierten Zellen (Bernhards *et al.*, 1983; Friedmann und Riccardi, 1988) und einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber der Lyse durch NK-Zellen (Cook *et al.*, 1987). Für die verringerte Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle auf Ad12-E1A/E1B-transformierten Zellen ist u. a. die C-terminale Domäne der konservierten Region 3 verantwortlich. Für die reduzierte Empfindlichkeit gegenüber der Elimination durch NK-Zellen ist der C-terminale Bereich ab der CR2 von Ad12-E1A von entscheidender Bedeutung (Huvent *et al.*, 1997; Abb. 4B). Der N-Terminus bis einschließlich der CR2 ist ebenfalls an der Verringerung der MHC-Klasse-I-Moleküle beteiligt (Pereira *et al.*, 1995).

1.3 r-SREC ein cytoplasmatisch lokalisierter Interaktionspartner von Ad12 E1A-Proteinen

Bei der Suche nach neuen Interaktionspartnern der adenoviralen E1A-Proteine wurde in unserer Arbeitsgruppe von S. Kullmann (S. Kullmann, unveröffentlicht) ein neues Gen identifiziert (Genbanknummer AF228917). Die Isolierung dieses Gens erfolgte bei einem Hefe-SOS-„Two-Hybrid“-Screen mit dem Köderprotein CR2-Spacer-CR3 von Ad12E1A

unter Verwendung einer Ratten Hypophysen cDNA-Bank. Das Produkt dieses Gens wurde als r-SREC („rat Small REC“) bezeichnet und besteht aus einem offenen Leserahmen von 366 aa, dessen Aminosäuresequenz in der Abb. 5 dargestellt ist.

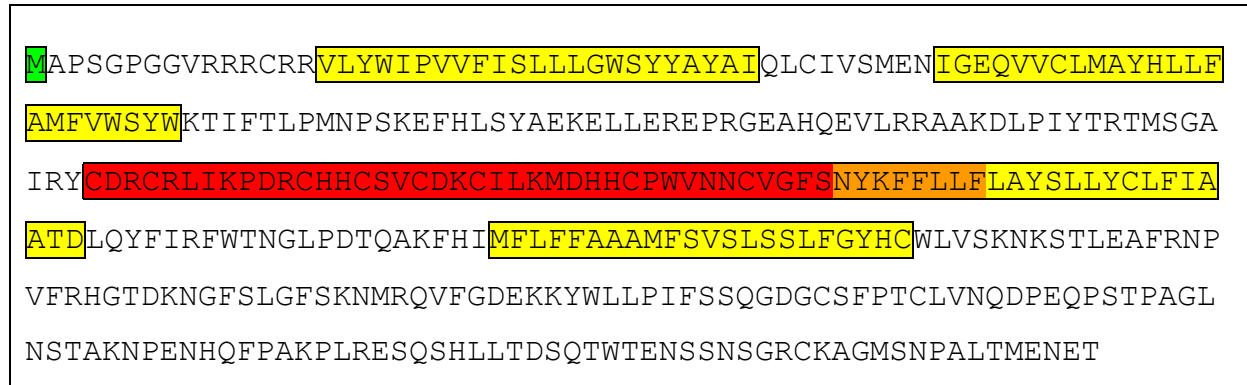


Abb. 5: Aminosäuresequenz des r-SREC-Proteins. Das r-SREC-Protein besteht aus 366aa (Start-Kodon wurde grün markiert). Die mittels Computeranalysen detektierten putativen Transmembrandomänen (gelb markiert) und die DHHC-Zinkfinger Domäne (roter Balken) sind gekennzeichnet.

Mit Hilfe von Computeranalysen (PSORTII, SMART) konnten vier putative Transmembrandomänen identifiziert werden (Abb. 5, gelber Balken). Sequenzvergleiche zeigen außerdem, dass die Aminosäuren 128-174 des Proteins eine neuartige cysteinreiche Zinkfinger-Domäne bilden, die als DHHC/New1 bezeichnet wird (Abb. 4 rot markiert) (Putilina. *et al.*, 1999). Die Funktion dieser Domäne ist weitgehend unbekannt (s. Abschnitt 1.5). Diese Domäne überlappt leicht mit der Transmembranregion 3 (8 aa, in Abb. 5 orange markiert). Sequenzvergleiche (GenBank, Swiss Prot) zeigen, homologe Domänen beispielsweise bei den Spezies *M. musculus*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *C. elegans*, *A. thaliana* und *H. sapiens* vorhanden sind.

Von Oyama und Mitarbeiter wurde im Jahr 2000 ein zu 97 % homologes humanes REAM-Gen identifiziert (reduced expression associated with metastases; Genbanknummer AB023584), das auf dem Chromosom 8p21.3-22 lokalisiert ist, bezeichnen sie als Bei der Untersuchung von drei Krebszelllinien, NL4, N117 N22, die von derselben murinen Kolon-Adenocarcinom-Zelllinie (Kolon 26) abstammen (Tsuruo *et al.*, 1983; Yamori *et al.*, 1988), jedoch unterschiedliches metastasierendes Potential aufwiesen und detektierten sie zunächst das murine Homolog des r-SREC-Gens. Diese chromosomale Region (8p) ist in einer Vielzahl an kolorektalen Tumoren (Fujiwara *et al.*, 1993, 1994; Ichii., *et al.*, 1993), hepatozellulären Karzinomen (Emi *et al.*, 1993; Fujiwara *et al.*, 1994; Qin *et al.*, 2001), nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen (Ohata *et al.*, 1993; Fujiwara *et al.*, 1994), Mamakarzinomen (Yaremko *et al.*, 1996; Anbazhagan *et al.*, 1998); Blasenkarzinomen

(Knoweles *et al.*, 1993) und Prostatakarzinomen (Bova *et al.*, 1993; Schulz *et al.*, 2002) deletiert und wurde daher schon zuvor als Lage von putativen Tumorsuppressorgenen diskutiert. Bei der Untersuchung von 16 primären kolorektalen Tumorgeweben und entsprechenden Normalgeweben, sowie deren Lebermetastasen konnte in zehn Fällen eine Reduktion der Expression des REAM-Gens um mehr als 50 % nachgewiesen werden. Weitere Studien an 51 kolorektalen Karzinomen, 30 hepatozellulären Karzinomen und 30 nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen wiesen in drei Fällen somatische Mutationen des REAM-Gens auf.

Alle bisherigen Informationen über das r-SREC-Protein wurden in unserer Arbeitsgruppe erstellt (S. Kullmann, unveröffentlicht). Northern-Blot-Analysen mit zeigten ein Transkript mit einer Größe von 1,6 kb und 3,4 kb in den Geweben Herz, Gehirn, Lunge, Niere und Hoden der Ratte. Als ATG-Initiationskodon wurde das Nukleotid 222 identifiziert, dass von einer Kozak-Sequenz (Consensus Motiv ANNATGG) umgeben ist, ein 5'-Richtung im gleichen Leserahmen identifiziertes Stoppkodon bestätigt dieses Startkodon.

Es konnte gezeigt werden, dass das r-SREC-Protein mit E1A-Proteinen *in vivo* und *in vitro* interagiert. Eine Reprimierung der E1A-vermittelten Aktivierung des E1B-Promotors, sowie des E2_{Ad12}-Promotors durch r-SREC konnte in transienten Expressionsstudien gezeigt werden. Erste Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigten, dass das r-SREC-Protein im Cytoplasma lokalisiert ist.

1.3.1 Struktur des Zinkfinger-Motivs DHHC

Die DHHC-Domäne, die das r-SREC-Protein enthält, gehört zur Gruppe der Zinkfinger-Domänen, die maßgeblich an der Ausbildung der Tertiärstruktur beteiligt sind (Dawid *et al.*, 1995; Klug, 1995; Sanchez-Garcia *et al.*, 1994; Saurin *et al.*, 1996). Die Zinkfinger-DNA-Bindedomänen von Transkriptionsfaktoren z. B. TFIIa-Typ (Pavletich *et al.*, 1991), Gal4-Typ (Pan *et al.*, 1991), GATA-Typ (Omichinski *et al.*, 1993) und Steroidrezeptoren wurden sowohl strukturell, als auch funktionell gut charakterisiert. Andere cysteinreiche Domänen, wie LIM-, RING- und PHD/LAP-Domänen (Dawid *et al.*, 1995; Schmeichel *et al.*, 1994; Lovering *et al.*, 1993; Aasland *et al.*, 1995; Saha *et al.*, 1995) werden mit Protein/Protein Interaktionen in Verbindung gebracht. Die LIM-Domäne beispielsweise, ein spezialisierter Doppel-Zink-Finger, konnte in Homeodomän-Proteinen, Proteinkinasen und in Proteinen, die mit dem Cytoskelett assoziiert sind, nachgewiesen werden.

Die im Jahre 1999 von Putilina *et al.* erstmals beschriebene DHHC-Domäne beinhaltet eine Region mit einer Cys4 Zink-Finger ähnlichen Metallbindestelle. Diese Domäne wurde daher als DHHC-Domäne (Einbuchstabencode Asparagin-Histidin-Histidin-Cystein) bezeichnet und kann in folgender Consensus Sequenz zusammengefasst werden:

$\boxed{\text{CX}_2\text{CX}_9\text{HCX}_2\text{CX}_2\text{CX}_4\text{DHHCX}_5\text{CX}_4\text{NX}_3\text{FX}_4}$

Diese Domäne ist dem in Hefen beschriebenen New1-Motiv sehr ähnlich (Bohm *et al.*, 1997), jedoch besitzt die DHHC-Domäne eine längere carboxyterminale Region.

Datenbankvergleiche mit der GenBank und der SwissProt Datenbank zeigten, dass diese Domäne über verschiedene Spezies hinweg hoch konserviert ist. Der hohe Grad an Konservierung dieser Domäne (13 aa absolut konserviert und 17 aa hoch konserviert) lässt vermuten, dass diese Domäne eine wichtige Funktion in der Zelle, möglicherweise bei der Protein/Protein-Interaktion oder Protein/DNA-Interaktionen spielt.

1.4 Zielsetzung

Das zelluläre r-SREC-Protein war zu Beginn meiner Arbeit hinsichtlich seiner Sequenz, seiner potentiellen Struktur, sowie der Expression in verschiedenen Geweben charakterisiert. Des Weiteren konnte eine Interaktion mit dem adenoviralen E1A-Protein *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden.

Ziel meiner Arbeit war es daher, die Bindung von r-SREC mit den adenoviralen E1A-Proteinen genauer zu untersuchen, seine Lokalisation in der Zelle zu analysieren und Hinweise auf mögliche Funktion des r-SREC-Proteins zu erhalten.

Untersuchungen des humanen Homolog des r-SREC-Proteins (REAM) durch Oyama und Mitarbeiter 2000 zeigten eine reduzierte Expression von REAM in einer Vielzahl von Tumoren. Da auch die chromosomale Region des REAM-Gens aufgrund einer Deletion bei einer Vielzahl an Tumoren bereits auf die Lage eines Tumorsuppressorgens hinwies, nahmen sie an, dass es sich bei REAM um ein Tumorsuppressorgen handeln könnte.

Da Protein Aph2, das ebenfalls eine DHHC-Domäne und strukturell ähnlich angeordnete Transmembrandomänen wie das r-SREC-Protein besitzt, an der ER-Stress induzierten Apoptose beteiligt ist, sollte untersucht werden, ob auch das r-SREC-Protein möglicherweise an der Regulation der Apoptose beteiligt ist.

Weitere Hinweise auf die Funktion des r-SREC-Proteins können entweder zelluläre Interaktionspartner oder die Änderungen der Expression von Genen geben, die von r-SREC-Funktionen reguliert werden. Daher sollte zum einen mit dem Hefe SOS-„Two-Hybrid“-System und einer embryonalen Rattenhypophysen cDNA-Bank Interaktionspartner des r-SREC-Proteins detektiert werden. Zum anderen sollten durch Genchip-Analysen Gene erfasst werden deren Expression möglicherweise durch r-SREC-Funktionen reguliert werden.

2. Material

2.1 Chemikalien

Hier nicht gesondert aufgeführte Chemikalien (mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“) sowie nicht erwähnter allgemeiner Laborbedarf wurden in der erforderlichen Qualität im Fachhandel bezogen.

Acrylamid	BioRad, München
Agarose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillin	Bayer, Leverkusen
Amplify	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Anisomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bacto Hefe Extrakt	Difco, Detroit, USA
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Pepton	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bicine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blue G250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CSM (Complete Supplement Mixture)	Q Biogene, Hamburg
Desoxyribonuclease I	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Desoxyribonukleotide	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

DMSO (Dimethylsulfoxid)	Fluka, Neu-Ulm
D-Sorbitol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Galaktose	Difco, Detroit, USA
Glukose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerin	Fluka, Neu-Ulm
HEPES (Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IPTG (Isopropyl- β -thiogalactosid)	Biomol, Hamburg
Mineralöl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N,N'-Methylen-bisacrylamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NP-40	Fluka, Neu-Ulm
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pefabloc	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
PEG 1000 (Polyethylenglycol)	Merck, Darmstad
Phemol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Fluka, Neu-Ulm
Raffinose	Difco, Detroit, USA
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TEMED (N,N,N',N'-Tertramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Triton-X-100	BioRad, München
Trypton	Difco, Detroit, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
YNB (Yeast Nitrogen Base)	Difco, Detroit, USA

2.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase (1 U/ μ l)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Klenow-Fragment der <i>E. coli</i> DNA-Polymerase I (2 U/ μ l)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
MasterTaq Kit	Eppendorf, Hamburg
Restriktionsendonucleasen (2-50 U/ μ l)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim Promega, Heidelberg
SUPER SCRIPT II RNaseH ⁻ Reverse Transkriptase (200 U/ μ l)	Gibco, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase (1 U/ μ l)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin (Rinderpankreas, 110 U/ mg)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

2.3 Oligonukleotide

Die aufgelisteten Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert.

Name	Sequenz
3'- Ras	5'- TCAGGACAGCACACATTT-3'
3'- r-SREC	5'- GCGCAAGCTTTCTCGTTCTCCATAGTTAA-3'
3'- LEU B	5'- AGGTGGATGCCGTTTTGTTAGGT-3'
3'- URA	5'- GCTTCAAACCGCTAACAATACCTG-3'
3'- nt-T1	5'- GCGCAAGCTTGTTTTCCATGGACACTATG-3'
3'- pcDNA4/T0/Myc/His B	5'- CTTAAGTTTAAACGCTAGAGTCCGGA-3'
3'- r-SREC T2-T3	5'- TATAAAGCTTATCTGTAGCAGCAATGAA-3'
3'- Ad12 E1A	5'- CGGGATCCATTACATCTAGGGCGTTTCACTGAC-3'
3'- pcDNA3.1 rsrec Ratte	5'- GCGCAAGCTTAGTCTCGTTCTCCATAG-3'
3'- r-SREC del DHHC	5'- GCGCAAGCTTATATCGGATCGCGCCGG-3'
5'- Ras	5'- AAGAGTGCCCTGACCATC-3'
5'- r-RSEC ATG	5'- ATATAAGCTTATGCACGAGCGGCGGAGCA-3'
5'- LEUA	5'- AAATGCGGTGTTCTTGTCTGG-3'
5'- URA	5'- AACCCAACCTGCACAGAACAAAAAC-3'
5'- Tet-Operator	5'- TCCCTATCAGTGATAGAGATCTCCCTATC-3'
5'- Ad12 E1A Δ 1-79	5'-CCCAAGCTTATGCCGGAGCCTCCTGTACTTTCTCCT-3'
5'- Tet-Operator	5'- TCCCTATCAGTGATAGAGATCTCCCTATC-3'
5'- pcDNA r-SREC	5'- ATATAAGCTTATGGCGCCCTCGGGCCCCGGT-3'
5'- r-SREC del N-term.	5'- GCGCAAGCTTTGTGACAGATGCCGACTT-3'
5'- T2-DHHC ATG	5'- GCGCAAGCTTATGATTGGTGAACAAGT-3'

2.4 Plasmide

pADNS-SOS	Hefe Expressionsvektor (Leucin [Leu]-Selektion), der die klonierten cDNAs als Fusionsproteine mit einem C-terminalen SOS-Anteil exprimiert (Aaronheim <i>et al.</i> , 1997), zur Verfügung gestellt von H. Hennemann, Institut für Zellbiologie, Uniklinikum Essen
pcDNA3.1(-)/Myc/His	Eukaryontischer Expressionsvektor, der die klonierten cDNAs als Fusionsproteine mit einem Myc-Epitop und einem C-terminalen Polyhistidin exprimiert (Invitrogen, Karlsruhe)
pcDNA4/T0/Myc/His	Eukaryontischer Expressionsvektor der in Kombination mit dem pCDNA6/TR die Tetrazyklin induzierbare Expression ermöglicht und die klonierten cDNAs als Fusionsproteine mit einem Myc-Epitop und einem C-terminalen Polyhistidin exprimiert (Invitrogen, Karlsruhe)
pcDNA6/TR	Eukaryontischer Expressionsvektor, der einen Tetrazyklin-Repressor unter der Kontrolle eines CMV-Promotors exprimiert (Invitrogen, Karlsruhe)
p-Flag-CMV-5a	Eukaryontischer Expressionsvektor, der die klonierten cDNAs als Fusionsproteine mit einem C-terminalen Flag-Epitop exprimiert (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
pGEM-T	Bakterieller Expressionsvektor, der aufgrund 3'-T-Überhängen die direkte Einklonierung von PCR-Produkten ermöglicht (Promega, Mannheim)
pGEX-4T-2	Bakterieller Expressionsvektor der die klonierten cDNAs als Fusionsprotein mit einer N-terminalen GST-Proteindomäne exprimiert (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
pYES2-GAP	Hefe Expressionsvektor (Tryptophan [Trp]-Selektion), der GAP (Aaronheim <i>et al.</i> , 1999), zur Verfügung gestellt von H. Hennemann, Institut für Zellbiologie, Uniklinikum Essen
pYES2-MYR	Hefe-Expressionsvektor (Uracil [Ura]-Selektion), der die klonierten cDNAs als Fusionsprotein mit einer N-terminalen <i>v-src</i> Myristylierungssequenz exprimiert (Aaronheim <i>et al.</i> , 1997), zur Verfügung gestellt von H. Hennemann, Institut für Zellbiologie, Uniklinikum Essen

2.5 Antikörper

Alexa Fluor 488 anti-Ziege IgG (H+L) Antikörper	MoBiTec, Göttingen
Anti-Kaninchen Alexa 488 konjugiert	Molecular Probes, Göttingen
Anti-Ziege IgG- AK Peroxidase-konjugiert	MoBiTec, Göttingen
Anti-Aktin (I-19) Antikörper polyklonaler Ziege IgG	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA
Anti-Flag-Antikörper polyklonal Kaninchen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Maus IgG Antikörper Peroxidase-konjugiert	Calbiochem, Heidelberg
Anti-Myc-Epitop (9E10) monoklonaler Maus IgG Antikörper	Invitrogen, Karlsruhe
ConA (Concanavalin A) Rhodamin konjugiert	Molecular Probes bezogen über Mo Bi Tec, Göttingen
Cy3-konjugierter AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Ratte anti-Maus IgG (H+L)-Antikörper	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc Bezogen über dianova, Hamburg
FITC-konjugierter F(ab') ₂ Fragment Esel anti-Maus IgG (H+L)-Antikörper	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc Bezogen über dianova, Hamburg

2.6 Medien, Reagenzien und Materialien für die Zellkultur

100 x nicht-essentielle Aminosäuren	Life Technologies, Eggenstein
6-Loch-Zellkulturschalen mit 3,5 cm Ø	Becton Dickinson, New York, USA,
Vertiefungen, Zellkulturplatten, -flaschen, -schalen	über Oehmen, Essen
Blasticidin-S-Hydrochlorid	Invitrogen, Niederlande
DMEM	Gibco, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA, Coelbe
Fötale Kälberserum (FKS), Tetrazyklin frei	Biochrom, Berlin
Geneticinsulfat (G 418)	PAA, Marburg
L-Glutamin	Merck, Darmstadt
MEM	Gibco, Karlsruhe
Mikrotiterplatten (Delta Surface)	Nunc, Neerijse, Belgien
Penicillin G (1000 U/ml)	Gibco, Karlsruhe
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe

2.7 Radiochemikalien

TRAN ³⁵ S-Label, beinhaltet 70 % L-Methionin, [³⁵ S] spez. Aktivität: 43,5 TBq/mmol 1175 Ci/mmol	ICN Biomedicals, Eschwege
--	---------------------------

2.8 Molekulargewichtstandards

1 kb plus Marker	Invitrogen, Karlsruhe
Rainbow TM [¹⁴ C] methyliertes Protein Molekulargewicht Marker	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
SDS-PAGE Standards (gefärbt)	BioRad, München Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

2.9 Kits und spezielle Reagenzien

Acid washed Glas Beads	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Alkalische Phosphatase	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
AnnexinV- FLUOS Staining Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
BioRad Bradford-Reagenz	BioRad, München
Casaminsäuren	Difco, Detroit, USA
DNeasy Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Genchip U133A	Affymetrix, USA
Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System	Amersham Pharmacia, Freiburg
Heringssperma DNA	Promega, Mannheim
Metafectene	Biontix, Martinsried
Moviol	Kuraray Specialities Europe, Frankfurt a. Main
Pefablock SC	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
pGEM [®] -T Vector System (TA-Cloning)	Promega, Mannheim
Plasmid-DNA-Maxipräparations Kit Nucleobond AX 500	Macherey & Nagel, Düren
QIAquick Spin PCR Purification and Gelextraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Qiagen, Hilden
RNase-Out (40U/μl)	Promega, Mannheim
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

RT-PCR Kit	Invitrogen, Karlsruhe
SuperSignal-West-Dura-Extended Duration Substrate (für Western-Blot)	Pierce, Rockford, USA; bezogen über Perbio, Helsingborg, Schweden
TNT Coupled Transcription/Translation System	Promega, Mannheim
TUNEL-Enzym	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
TUNEL-Label	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

2.10 Filme, Filter, Membranen und besondere Verbrauchsmaterialien

Accutran Replika Plater	Schleicher & Schuell, Dassel
Biomax-Filme	Kodak, Rochester, USA
Elektroporationsküvetten, 0,4 mm	BioRad, München
Gluthation-Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hybond-C-plus Nitrocellulose-Membran	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hybond-N Nylon-Membran	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hyperfilm ECL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Röntgenfilme X-Omat AR	Kodak, Rochester, USA
Rotiszint eco plus Szintilisationsflüssigkeit	Roth GmbH, Karlsruhe
Sterivex-GS 0,22 µm Filter Unit	Millipore, Bedford, Massachusetts, USA
Whatman Filterpapier	Whatman, Maidstone, England

2.11 Spezielle Laborgeräte

DNA Trio Thermoblock (PCR)	Biometra, München
Gene Pulser Elektroporator	BioRad, München
Gene Quant RNA-DNA Calculator	Pharmacia Biotech, Freiburg
HP GeneArray TM Scanner	Affymetrix, USA
Laser Densitometer Ultrascan XL	Pharmacia Biotech, Freiburg
Mini-Protean-II-Cell	BioRad, München

Rotationsinkubator	Biometra, Göttingen
Szintillationsmessgerät Delta 300	Searle Analytic Incorporation, über Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München
Ultraschalldesintegrator	Branson, USA
Zeiss Laser Scan Mikroskop (LSM) 510	Zeiss, Obercochem

2.12 Puffer und Lösungen

Hier nicht aufgeführte Zusammensetzungen von Puffern und Lösungen wurden den Laborhandbüchern „Molecular Cloning: a laboratory manual, second edition“ (Sambrook *et al.*, 1989) oder „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausübel *et al.*, 1997) entnommen.

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	29,2 g Acrylamid 0,8 g N,N'-Methylen-Bisacrylamid mit A. bidest ad. 100 ml
2 x YT-Medium	16 g Tryptone 10 g Bacto- Hefe-Extrakt 5 g NaCl ad. 1 l A. bidest
Ampicillinlösung	50 mg/ml in A. bidest
APS-Lösung	10 % (w/v) APS
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH

DNA-Probenpuffer (6 x)	150 mM EDTA 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylenxanol FF 30 % (v/v) Glycerin
dNTP-Mix (für PCR)	je 1,25 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP in A. bidest
Gelfärbelösung (SDS-PAGE)	450 ml A. bidest 450 ml Methanol 100 ml Eisessig 2,5 g Coomassie Brilliant Blue
Gelfixierlösung (SDS-PAGE)	50 % (v/v) 2-Propanol 7 % (v/v) Essigsäure
Hefe-Aufbruchpuffer	2 % (v/v) Triton X-100 1 % (w/v) SDS 100 mM NaCl 1 mM EDTA
LIPEG	100 mM Lithiumacetat (pH 7,5) 40 % Polyethylenglycol 3350 in TE-Puffer (pH 7,5)
LISORB	100 mM Lithiumacetat (pH 7,5) 1 M Sorbitol in TE-Puffer (pH 7,5)

Moviol	6 g Glycerin 2,4 g Moviol Nach Anleitung des Herstellers herstellen und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagern
NB-Puffer	150 mM NaCl 10 mM Bicine, pH 8,35
NETN-Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 8 100 mM NaCl 1 mM EDTA 0,4% NP40 1:200 Pefablock kurz vor Gebrauch zugeben
Neutralisations-Lösung	1,5 M NaCl 0,5 M Tris-HCl, pH 7,2 1 mM Na_2EDTA
NP-40 Lysepuffer	150 mM NaCl 1 % NP-40 50 mM Tris, pH 8
Paraformaldehyd-Lösung	3 % Paraformaldehyd in PBS^- , pH 7,4
PBS	4 mM MgSO_4 7 mM CaCl_2 1,4 mM KH_2PO_4 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na_2HPO_4

PBS-Tween	0,1 % Tween in PBS ⁻
PBS ⁻	wie PBS, ohne MgSO ₄ und CaCl ₂
PEG1000-Lösung	40 % PEG1000 200 mM Bicine, pH 8,35 bei – 20 °C gelagert
primärer Waschpuffer (für Southern-Blots)	2 M Harnstoff 0,1 % (w/v) SDS 50 mM NaPhosphate (pH 7,0) 150 mM NaCl 1 mM MgCl ₂ 0,2 % Blockierungsreagenz
PS-Lösung	1,5 g Penicillin 2,5 g Streptomycin 2 g NaCl 0,1 g KCl 0,25 g Glukose 0,1 g NaHCO ₃ mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt
RT-Erststrangsynthese-Puffer	250 mM Tris/HCl, pH 8,3 375 mM KCl 15 mM MgCl ₂
SBEG-Puffer	1 M Sorbitol 10 mM Bicine, pH 8,35 3 % (v/v) Ethylenglycol

SDS-PAGE-Laufpuffer (1 x)	250 mM Tris/HCl, pH 8,3 2,55 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
SDS-PAGE-Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer (6 x)	0,3 M Tris/HCl pH 6,8 0,6 M DTT 12 % (w/v) SDS 60 % (v/v) Glycerin 0,6 % (w/v) Bromphenolblau
sekundärer Waschpuffer (20x Stock)	1 M Tris Base 2 M NaCl pH mit NaOH auf pH 10 einstellen und auf 1 l mit A. bidest auffüllen vor Gebrauch 2 ml/ l 1 M MgCl ₂ zugeben
SSC (20 x)	3,0 M NaCl 0,3 M Na ₃ -Citrat
TAE-Puffer (10 fach)	100 mM Tris 10 mM EDTA

Transferpuffer (für Western- Blots)	48 mM Tris 39 mM Glycin 0,037 % (w/ v) SDS 20 % (v/ v) Methanol
VT-Lösung	0,5 M EDTA 2,5 g/ l Trypsin in PBS ⁻
YNB- (+) Galaktose	1,36 g YNB ohne AS, ohne Ammoniumsulfat 4 g Ammoniumsulfat 24 g Galaktose 16 g Raffinose 16 g Glycerin 0,54 g Drop out mix 12 g Bactoagar ad. 0,8 l A. bidest
YNB -(Gukose)	1,36 g YNB 4 g Ammoniumsulfat 16 g D(+)-Glukose 0,54 g Drop out mix 12 g Bacto-Agar ad. 0,8 l A. bidest

YNB (-)-Galaktose	1,36 g YNB 4 g Ammoniumsulfat 16 g Raffinose 16 g Glycerin 0,54 g Drop out mix 12 g Bacto-Agar ad. 0,8 l A. bidest
YPD	10 g Hefeextrakt 20 g Bacto-Pepton 20 g D(+)-Glucose 12 g Agar ad. 1 l A. bidest

2.13 Bakterienstämme und Hefestämme

E. coli K12 DH5 α [*supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* M15) *hsdR* 17 *recA1* *endA1* *gyrA96*, *thi1* *relA1*] ist ein rekombinationsdefekter Bakterienstamm zur Vermehrung von Derivaten der pBR322-Plasmide (Gibco, Eggenstein).

E. coli K12 DH10B [*F*⁻ *mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcr-BC*), Φ 80*dlac* Z Δ M15, Δ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *araD139*, Δ (*ara*, *leu*)7697, *galU*, *galK*, α^- , *rpsL*, *nupG*] ist ein elektrokompenter Bakterienstamm (Gibco, Eggenstein).

E. coli K12 BL21 (*F*⁻, *ompT*, *hsdS* (*rB*⁻, *mB*⁻), *gal*) ist ein Protease-defizienter Bakterienstamm zur Expression von Fusionsproteinen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

Cdc 25-2 ist ein temperatursensitiver *S. cerevisiae* Stamm. Dieser Hefestamm enthält eine Mutation im *cdc-25-2-Gen*, das den G-Protein-Austauschfaktor SOS exprimiert (Aaronheim *et al.*, 1997)

2.14 Zelllinien

293-Zellen	Humane embryonale Nierenzelllinie mit Ad12 E1A und E1B transformiert, American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA (Graham <i>et al.</i> , 1995)
HEK12-Zellen	Humane embryonale Nierenzelllinie, transformiert durch Transfektion des <i>EcoR</i> IC-Fragments von Ad12 (Whittaker <i>et al.</i> , 1984); zur Verfügung gestellt von P. Gallimore, University of Birmingham, UK
HeLa-Zellen	Humane epitheloide Cervix-Karzinomzelllinie; American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA (Gey <i>et al.</i> , 1952)
KB-Zellen	Humane epidermale Rachen-Karzinomzelllinie; American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA (Gey <i>et al.</i> , 1952)
T-REx-HeLa-Zellen	HeLa-Zellen, die stabil mit dem Plasmid pCDNA6/TR transformiert sind (Invitrogen, Karlsruhe)

3. Methoden

3.1 Allgemeine Methoden

Hier nicht gesondert aufgeführte molekularbiologische Arbeitstechniken wurden gemäß den Laborhandbüchern „Molecular Cloning: a laboratory manual, second edition“ (Sambrook *et al.*, 1989) und „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausübel *et al.* 1997) durchgeführt.

Das Arbeiten mit Säugerzellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Lösungen und Materialien wurden bei 121 °C und 1 bar autoklaviert. Lösungen mit hitzeempfindlichen Komponenten, wurden sterilfiltriert.

3.2 Isolierung und Charakterisierung von Nukleinsäuren

Die Aufreinigung PCR-amplifizierter oder restringierter DNA, sowie die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des „QIAquick Spin PCR Purification and Gelextraction-Kits“ (Firma Qiagen). Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im quantitativen Maßstab erfolgte unter Verwendung des „Plasmid-DNA-Maxipräparationskits Nucleobond AX 500“ (Macherey & Nagel). DNA-Sequenzierungen wurden von der Sequenzierfirma Seqlab GmbH (Göttingen) oder der Firma GATC (Konstanz) durchgeführt.

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Mullis et al, 1986)

Die PCR ist eine *in vitro* Methode zur sequenzspezifischen Amplifikation distinkter DNA-Sequenzen unter Verwendung synthetisch hergestellter Oligonukleotide. Diese Methode wurde zum Nachweis der Integration von DNA-Sequenzen in das Genom von Säugerzellen, zur Identifizierung Insert-positiver Bakterienklone, zum Nachweis durch RT-PCR generierter cDNAs und zur Klonierung von DNA-Sequenzen angewendet.

3.2.2 Southern-Blotting (Southern, 1975)

Zum Nachweis der Integration von r-SREC in das Genom der T-REx HeLa Zellen wurden Southern-Blot Analysen durchgeführt. Aus ca. $2 \cdot 10^6$ Zellen wurde unter Verwendung des „QIAamp Tissue-Kits“ genomische DNA isoliert. Anschließend wurden zwischen 20 µg und

30 µg DNA (maximales Volumen 150 µl) jeder Zelllinie mit 100 U der Restriktionsendonuklease *ECORV* über einen Zeitraum von mindestens 8 h vollständig restringiert und die erhaltenen Fragmente über 1 %ige Agarosegele bei ca. 10 V/cm² aufgetrennt. Durch Inkubation der Gele in 0,25 M HCl wurden hochmolekulare DNA-Fragmente lysiert und damit der Transfer von DNA Fragmenten >10 kDa gewährleistet. Anschließend wurde die DNA durch Behandlung mit Denaturierungslösung (zweimal 20 min) in Einzelstrang-DNA überführt. Nach Inkubation in Neutralisationslösung (zweimal 20 min) wurde die DNA mit Hilfe der Kapillar-Blot Methode unter Verwendung von 20 x SSC als Transferpuffer auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Die Quervernetzung der DNA mit der Membran erfolgte durch 10-minütige UV-Bestrahlung (312 nm) der getrockneten Membran auf einem Standard-Transilluminator.

3.2.2.1 Hybridisierung von DNA

Die Detektion von Zielsequenzen in der Zell-DNA erfolgte durch Hybridisierung der Membranen mit der Sonde. 60 ng der Sonden-DNA wurden durch 5-minütiges kochen im Wasserbad denaturiert und nach Angaben des Herstellers an alkalische Phosphatase gekoppelt. Die Hybridisierung des Blots mit der Sonde im Hybridisierungspuffer erfolgte über Nacht im Hybridisierungsofen bei 55 °C. Der Southern-Blot wurde im auf 55 °C vorgewärmten primären Waschpuffer zweimal 10 min unter leichtem Schütteln gewaschen und anschließend 5 min in sekundärem Waschpuffer inkubiert. Nach Entfernung des überschüssigen Puffers wurde der Blot mit der Oberseite nach oben in eine saubere Schale gelegt und 15 ml Detektionsreagenz aufgetropft. Anschließend wurde der Blot mittels Autoradiographie unter Verwendung eines Hyperfilm ECL visualisiert.

3.2.3 Strippen des Southern Blots

Um den Southern Blot gegebenenfalls erneut Hybridisieren zu können, wurde der Blot für 60 min in 0,5 % (w/v) SDS-Lösung bei 60 °C inkubiert. Danach wurde die Lösung abgeschüttet und 5 min bei Raumtemperatur in 100 mM Tris-Lösung (pH 8) inkubiert. Die Lagerung des Blots erfolgt bei 4 °C.

3.2.4 Isolierung von totaler RNA aus humanen Zelllinien

Alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt und RNase freie Lösungen und Geräte benutzt. Die Isolierung der totalen RNA erfolgte mit Hilfe der „QiaShredder“-Säulen und anschließender Aufreinigung über das „RNeasy Mini Kit“ mit DNase-Verdau auf der Säule.

3.2.5 Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Der Nachweis spezifischer mRNAs in Gesamt-RNA aus T-REx-HeLa-Zellen erfolgte mittels RT-PCR. Die Erststrangsynthese erfolgte unter Verwendung des RT-PCR Kits der Firma Invitrogen. Ein Ansatz, bestehend aus 4 µg Gesamt-RNA und 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM) und 2 pmol eines spezifischen 3'-Primers, wurde mit DEPC-behandeltem Wasser (im Kit enthalten) auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt, 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend 2 min auf Eis schockgekühlt.

Nach Zugabe von 4 µl 5 x RT-Erststrangpuffer, und 2 µl 0,1 M DTT, sowie 1 µl RNase-Out wurde der Ansatz 2 min bei 42 °C inkubiert. Die Synthese des cDNA-Stranges erfolgte nach Zugabe von 1 µl (200 U) Reverse-Transkriptase (Superscript) mit nachfolgender Inkubation für 50 min bei 42 °C. Die Reverse-Transkriptase wurde anschließend durch 15-minütige Inkubation bei 70 °C inaktiviert.

Die weitere Analyse der generierten cDNA erfolgte durch PCR-Amplifikation mit spezifischen Primern und anschließender Agarose-Gelelektrophorese.

3.2.6 Genchip-Assays

3.2.6.1 Aufbau des Affymetrix U133A Genchips

Es wurde der humane Genchip U133A der Firma Affymetrix verwendet. Auf diesem Chip (1,28 x 1,28 cm²) sind Sequenzen von 1.000.000 verschiedenen cDNAs synthetisiert. Die Sequenzen entstammen den Genbanken UNIGene, GenBank, TIGR (The Institute for Genomic Research).

Die Fläche auf der das Oligonukleotid auf den Chip synthetisiert wurde, wird als Probenzelle bezeichnet (s. Abb. 6). Jedes zu untersuchende Gen ist durch 20 Oligonukleotide auf dem Chip repräsentiert. Es wird hierdurch die Spezifität der Analyse gewährleistet. Die Effekte gelegentlicher Kreuzhybridisierungen zwischen mRNA und Oligonukleotid werden

auf diese Weise gemindert. Des Weiteren ist für jedes spezifische Oligonukleotid („perfect match“ (PM)) ein unspezifisches Oligonukleotid („mismatch“ (MM)) auf dem Chip enthalten, das die gleiche Oligonukleotidsequenz wie das PM besitzt, jedoch eine Punktmutation in der Mitte der Sequenz aufweist. Das unspezifische Oligonukleotid dient als interne Kontrolle, die Aussagen über die Qualität des Signals liefert. Die Summe der Signale nach der Hybridisierung mit mRNA für die PM-Probenzellen muss größer sein als die der unspezifischen MM-Probenzellen, wenn eine spezifische Hybridisierung vorliegt. Ein Probenpaar besteht jeweils aus einer PM- und einer MM-Zelle.

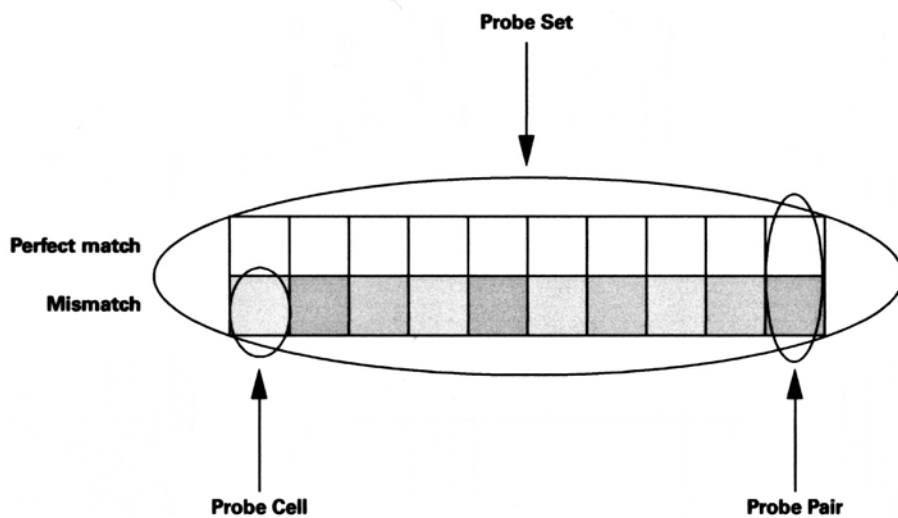


Abb. 6: Aufbau einer Probenzelle des Affymetrix-Genchips. Ein kompletter Probensatz besteht aus 20 Probenzellen. Von jedem Oligonukleotid ist auf einer Probenzelle die Oligonukleotidsequenz aufgespottet („Perfect Match“), sowie die Oligonukleotidsequenz mit einer Punktmutation („Mismatch“). Die entsprechenden Probenzellen eines „Perfect Match“ mit entsprechendem „Mismatch“ bilden zusammen ein Probenpaar.

3.2.6.2 Durchführung und Auswertung des Affymetrix-Genchips

Für den Affymetrix-Genchip U133A wurden 9 µg mRNA eingesetzt und der Genchip nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Scannen der Chips erfolgte mit einem HP GeneArray TM Scanner (Affymetrix). Die durchschnittliche Intensität der Probenzelle wird berechnet.

Im Folgenden werden die wichtigsten Algorithmen bei der Auswertung der Genchips beschrieben, die englischen Originalbezeichnungen werden weitgehend beibehalten. Die Algorithmen wurden von der Firma Affymetrix empirisch ermittelt. Die Auswertung wurde mit den Programmen GeneChip und Data Minimising Tool (Affymetrix) durchgeführt.

Bei der Auswertung der Genchips wird zunächst der „**Absolute Call**“ (AbsCall) bestimmt, der angibt, ob ein Probensatz auf einem Chip als anwesend (Present = P) oder nicht anwesend (Absent = A) berechnet wird. Die Zelle wird als positiv bewertet, wenn die Differenz aus den Intensitäten von PM und MM über dem Schwellenwert liegt und der Quotient aus PM und MM über 1,5 liegt. Anschließend wird die Log AVG Ratio ermittelt, die ein Maß für die Hybridisierungseffizienz von PM und MM darstellt. Hybridisieren beide mit gleicher Effizienz, so nimmt die Log AVG Ratio den Wert Null an. Ein weiterer Algorithmus gewichtet diese drei Größen unterschiedlich und ermittelt so den Abs Call „P“ (Present), „A“ (Absent), oder „M“ (Marginal). Bei Vergleich zweier Genchips-Analysen wird bestimmt, ob die bestimmte Genexpression des ein Probensatz gegenüber dem zu vergleichenden Probensatz induziert („Induced“ = I), reprimiert („Decreased“ = D) ist, oder ob kein Unterschied besteht („No Change“ = NC). Dieser Parameter wird als „**Difference Call**“ (Diff Call) bezeichnet. Um welchen Faktor ein Probensatz gegenüber dem zu vergleichenden Probensatz induziert bzw. reprimiert ist gibt die sog. „**fold change**“ an. Es wurden nur Gene berücksichtigt deren „fold change“ mindestens um Faktor zwei variierte. Durch den Einsatz verschiedener „Spikingkontrollen“ wird die Qualität der Detektion überprüft.

3.3 Analyse von Proteinen

3.3.1 Herstellung von Gesamtzell-Proteinextrakten aus Säugerzellen

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Kulturzellen wurden konfluent gewachsene Zellen in 4 °C kaltem PBS⁻ gewaschen und anschließend durch Abschaben in PBS⁻ geerntet und durch Zentrifugation bei 1500 x g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden durch resuspendieren in NP40-Lysepuffer und anschließendem Schütteln für 30 min bei 4 °C lysiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei 52000 x g und 4 °C 30 min pelletiert und der klare Überstand abgenommen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm nach der Methode von Bradford (1976) mit dem Bradford Reagenz.

3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in Polyacrylamidgelen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen im diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli (1970). Die Trenngele (12 %, C-Wert: 2,7 %) und Sammelgele (5 %, C-Wert: 2,7 %) wurden nach Sambrook *et al.* (1989) angefertigt. Die Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer (Endkonzentration: 1 x SDS-Probenpuffer) vermischt und 10 min gekocht. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer Mini-Protean-II-Dual-SLAB-Kammer.

3.3.3 Western-Blotting (Harlow und Lane, 1988)

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen in Extrakten aus Kulturzellen oder aus Tumorgewebe wurden die Extrakte durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch ElektrobloTTing (Semi-Dry-Blot-Apparatur, 1–2 h, 1,7 mA/ cm²) auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond C+) transferiert. Vor Gebrauch wurde die Nitrozellulosemembran kurz mit A. bidest angefeuchtet und anschließend für 10 min in Transferpuffer äquilibriert.

Nach dem Transfer wurde die Membran 1 h mit 1 x PBS-Tween/10 % Milchpulver unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen, und anschließend in derselben Lösung für 12 h bei 4 °C mit dem anti-Myc Antikörper (Verdünnung 1 : 1000) inkubiert. Die Membran wurde dreimal 10 min in PBS-T gewaschen und anschließend mit einem sekundären, Meerrettich-Peroxidase konjugierten Antikörper, der gegen den F_c-Anteil des Primär-Antikörpers gerichtet ist, für 1 h in PBS-T/1 % Milchpulver (Verdünnung 1 : 20.000) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen (dreimal 10 min PBS-T, zweimal 5 min PBS) erfolgte die Detektion der Antigen-Antikörperkomplexe durch das Detektionssystem gemäß den Angaben des Herstellers.

Sollte die Membran anschließend weiteren Antikörperreaktionen unterzogen werden, wurden die bestehenden Antigen-Antikörperkomplexe durch Inkubation in PBS-0,2 % Tween-20 für 45 min bei 70 °C unter leichtem Schütteln dissoziiert. Danach wurde die Membran kurz in TBS gewaschen und einer erneuten Antikörperreaktion unterzogen.

3.3.4 Protein/Protein-Interaktionsstudien mittels GST-„Pull-Down“-Assay

3.3.4.1 *In vitro* Translation

R-SREC und die Mutanten von r-SREC wurden mit Hilfe des TNT-T7 coupled *in vitro* Translation/Transcription Kit unter Verwendung von S³⁵ Methionin/TRAN-Label nach Angaben des Herstellers *in vitro* translatiert.

3.3.4.2 Incorporationsassay

Um die Menge des eingebauten S³⁵-Methionin/Cyteins zu bestimmen, wurde ein Incorporationsassay nach Angaben des Herstellers mit 2 µl der Translationsreaktion durchgeführt und die Anzahl der Zerfälle gemessen

3.3.4.3 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Die E1A-Mutanten waren in das Plasmid pGEX-4T-2 einkloniert und wurden in *E. coli* BL21 Bakterien transformiert. Einzelne Klone wurden gepickt und eine Übernachtskultur in 2xYT-Medium angeimpft. Die Übernachtskultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 herunter verdünnt (ca. 1 l) und beim Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,8-1 die Expression des GST-Fusionsproteins durch Zugabe von 100 µl 1 M IPTG für 1-2 h induziert. Anschließend wurde die Kultur gedrittelt und jeweils 1 Aliquot, wie im Folgenden beschrieben, aufgereinigt. Das Pellet wurde in 10 ml NETN-Puffer resuspendiert, 50 µl einer Lysozymlösung (100 mg/ml) zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit dem Ultraschalldesintegrator beschallt, um die Bakterien vollständig zu lysieren. Nach einer Zentrifugation (18300 x g, 20 min) wurden 200 µl mit NETN-Puffer gewaschene Gluthationsepharose-Beads zugegeben, die zuvor durch 15 minütige Inkubation mit Milchpulver NETN-Puffer abgesättigt worden waren. Der Ansatz wurde 1 h bei 4 °C auf einem Über-Kopf-Schüttler inkubiert und mit NETN-Puffer gewaschen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm nach der Methode von Bradford (1976) mit dem Bradford-Reagenz. Die portionierten GST-Fusionsproteine wurden bei -80 °C gelagert.

3.3.4.4 Durchführung des GST-„Pull Down“-Assays

Für den GST-„Pull-Down“-Assay wurden 100.000 CPM *In-vitro*-Translatat und 30 µg des jeweiligen GST-Fusionsproteins eingesetzt. Die Volumendifferenz der einzelnen GST-Proteine wurde mit gewaschenen Gluthationsepharose-Beads ausgeglichen und 300 µl WCE-Puffer zugegeben. Das Gemisch wurde 90 min bei 4 °C auf einem Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Beads dreimal mit 1 ml WCE-Puffer gewaschen und der Überstand vollständig abgenommen. Nach Zugabe von 30 µl SDS-Probenpuffer wurden die Proben aufgekocht (10 min). Zur Überprüfung der einzelnen Mengen an GST-Fusionsproteine wurden 7 µl der Probe auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen und danach mit Coomassie-Lösung gefärbt. Der restliche Ansatz (23 µl) wurde ebenfalls auf ein 12-16 % SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Gellauf wurde dieses Gel jedoch fixiert, mit Amplify inkubiert und anschließend auf einem Vakuumentrockner getrocknet. Danach wurden die Banden unter Verwendung einer Verstärkerfolie und eines Biomax-Films mittels Autoradiographie visualisiert.

3.3.5 Protein/Protein-Interaktionsstudien mittels Hefe SOS-„Two-Hybrid“-System

3.3.6 Das Hefe SOS-„Two-Hybrid“-System

Das System basiert auf der Beobachtung, dass Ras-GEF, hSOS, bei seiner Rekrutierung an die Plasmamembran aktiviert (Aronheim *et al.*, 1994; Quilliam *et al.*, 1994). Bei Hefen kann die Aktivität von Ras-GEF in einem Hefestamm, dessen Ras-GEF mutiert ist, leicht untersucht werden. Eine dieser mutierten Hefestämme ist der temperatur-sensitive Hefestamm *cdc-25-2* (Petijean *et al.*, 1990). Dieser Hefestamm ist in der Lage, bei der restriktiven Temperatur von 36°C abhängig von der Expression von funktionellem Ras-GEF zu wachsen (Martegani *et al.*, 1992). Alternativ, das Säuger Ras-GEF, hSOS ist in der Lage die *cdc25-2* Mutation zu komplementieren, wenn es an der Plasmamembran exprimiert wird (Aronheim *et al.*, 1994). Die Voraussetzung für die Membranlokalisierung des SOS-Proteins kann durch die Interaktion zweier Hybrid-Proteine erreicht werden (Aronheim *et al.*, 1997).

Das zu untersuchende Protein wird mit dem SOS-Protein fusioniert (Köderprotein), der Protein Partner (cDNA-Bank) ist fusioniert an ein Membran-Lokalisierungs-Signal, das v-Src Myristilisierungssignal. Das cDNA-Bank Expressionsplasmid steht unter der Kontrolle eines Gal1-Promotors (West *et al.*, 1987). Mit Verlauf der Durchmusterung werden Kandidaten-

Klone selektiert, die bei der restriktiven Temperatur von 36 °C auf Galaktosemedium wachsen.

Das humane Ras-Protein umgeht die für die Selektion benötigte Interaktion, da die GTPasen der Hefe (Ira 1/ 2) nicht in der Lage sind, die mRas-Funktion zu inaktivieren. Durch die zusätzliche Transformation mit mGAP im Expressionsvektor pYES2 kann die Funktion des mRas effizient inhibiert werden (Aronheim *et al.*, 1997).

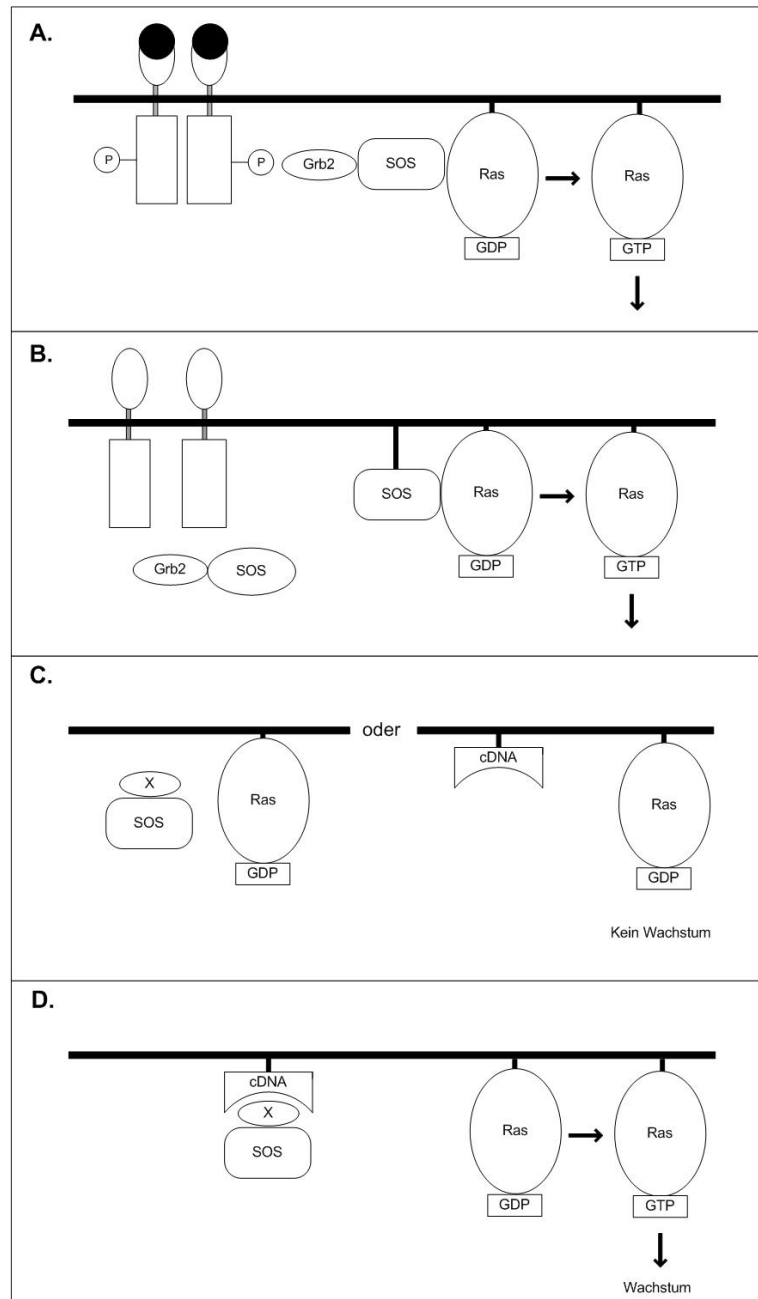


Abb. 7: Funktionsprinzip des Hefe SOS-„Two-Hybrid“-Systems

(A) Ras-Aktivierung durch das SOS-Protein über Wachstumsfaktor Rezeptoren.

(B) konstitutive Bindung an die Plasmamembran.

(C), (D) SOS-„Two-Hybrid“-System.

(A) In nicht stimulierten Zellen ist das SOS-Protein mit Grb2 komplexiert. Durch die Aktivierung von Wachstumsfaktoren werden die Phosphotyrosin-Bindestellen von Grb2 freigegeben. Daraus resultiert die Rekrutierung des Grb2-SOS Komplexes an den Rezeptor und die Membran, der Ras-abhängige Signaltransduktionsweg wird aktiviert und den Hefezellen ist es möglich bei der selektiven Temperatur von 36 °C zu wachsen. (B) Die Fusionierung von SOS an Myristylierungs- oder Farnylierungs-Signale führt zu einer Konzentration von SOS in der Plasmamembran und daraus resultierend zu einer Ligant unabhängigen Ras-Aktivierung. (C und D) In Zellen, die ein Chimere aus SOS und dem zu untersuchenden Protein (X) und eine durch ein angehängte Myristylierungssignal membrangebundenes cDNA-Bank Protein besitzen, ist bei fehlender Interaktion von X an das Protein der cDNA-Bank kein Wachstum möglich (C). Die Bindung von X an das cDNA-Bank Protein führt zu einer Rekrutierung von SOS an die Plasmamembran und somit zur Aktivierung von Ras und zum Wachstum der Zellen. (modifiziert nach Aaronheim *et al.*, 1997)

3.3.6.1 Herstellung kompetenter Hefezellen (Klebe et al., 1983)

Ein Einzelklon des Hefestammes *cdc25-2* wird über Nacht in 10 ml YPD-Medium bei 25 °C unter Schütteln über Nacht inkubiert (220 rpm). Nach Zugabe von 250 ml YPD-Medium (nicht unter OD₅₉₅ kleiner 0,1) wird die Kultur unter Schütteln bis zu einer optischen Dichte von 0,6 bei 595 nm inkubiert (5-8 h). Nach der Abzentrifugation der Zellen bei 425 x g für 3 min bei Raumtemperatur wird das Pellet in 125 ml SBEG-Puffer vorsichtig resuspendiert. Die Zellen werden erneut zentrifugiert, in 5 ml SBEG-Puffer resuspendiert, aliquotiert und für mindestens 15 min bei -80 °C eingefroren oder gelagert.

3.3.6.2 Transformation kompetenter Hefezellen (Klebe et al., 1983)

Die kompetenten Hefezellen werden bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und mit 1 µg jeder Plasmid-DNA vermischt. Pro Ansatz werden 750 µl 40 % (w/v) Polyetylen glycol in 200 mM Bicine (pH 8,35) zugegeben und für 1 h bei 25 °C im Wasserbad inkubiert. Der Ansatz wurde dabei alle 15 min gevortext. Nach Zentrifugation bei 8000 x g für 2 min bei Raumtemperatur wird das Pellet in 1 ml NB-Puffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Vom Überstand werden 900 µl abgenommen, die Hefen im verbleibenden Puffervolumen resuspendiert, und auf YNB-Selektionsmedium (-LEU, -TRP) ausplattiert.

3.3.6.3 Herstellung kompetenter Hefezellen zur Transformation mit der cDNA Bank (nach Schiestl und Grietz, 1989)

Ein Hefeklon wird in 10 ml YNB-Glukosemedium (-TRP, -LEU) resuspendiert und über Nacht bei 25 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend werden 200 ml YNB-Glukosemedium (-TRP, -LEU) zu der ersten Übernachtskultur gegeben und die Hefen erneut über Nacht bei 25 °C unter Schütteln inkubiert.

Die Hefekultur wird abzentrifugiert bei 1500 x g für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Pellet wird nun in 200 ml YPD-Medium resuspendiert und die Hefekultur bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,5 bei 600 nm unter Schütteln bei 25° C inkubiert. Die Zellen werden pelletiert (1500 x g, 5min) und zweimal mit 10 ml A. bidest gewaschen. Die Hefen werden anschließend in 10 ml LISORB-Puffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert (1500 x g, 5 min). Das Pellet wird in 2,5 ml LISORB-Puffer resuspendiert und nach einer Inkubationszeit von 30 min unter Rotation zur Transformation pro Ansatz 50 µl eingesetzt.

Während der Inkubation wird die Carrier-DNA vorbereitet. Es werden 250 µl Heringssperma-DNA mit 250 µl A. bidest gemischt und durch aufkochen denaturiert (20 min). Anschließend erfolgt eine 5 minütige Inkubation auf Eis und eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min. Die Carrier-DNA wird anschließend mit 400 µl LISORB-Puffer verdünnt und verbleibt bei Raumtemperatur bis zum Gebrauch.

3.3.6.4 Hefetransformation mit der cDNA-Bank

Für einen Transformationsansatz werden 3 µg Bank DNA, 50 µl Carrier-DNA-Mix und 50 µl kompetente Hefezellen gemischt und für 30 min bei ca. 25 °C inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl LIPEG-Puffer werden sie auf einem Über-Kopf-Schüttler 30 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock für 15 min bei 42 °C und anschließender Abkühlung auf Eis. Der Transformationsansatz wird durch Zentrifugation bei 13000 x g für 2 min pelletiert und in 60 µl 1 M Sorbitol aufgenommen. Mit Hilfe eines Spatels wird der Ansatz nun auf einer Agarplatte mit YNB-Glukosemedium (-LEU, -TRP, -URA) ausplattiert. Um die Anzahl der transformierten Klone zu ermitteln, werden auf einer Platte zur Titration 2 µl sowie eine 1:40 und eine 1:80 Verdünnung des Transformationsansatzes aufgetragen und anschließend bei 25 °C für 2-3 Tage inkubiert. Zur Kontrolle auf Kontaminationen wird ein Ansatz auf YPD-Medium und zur Kontrolle auf Revertanten des Hefestammes wird ein Ansatz auf YNB-Glukosemedium ausplattiert. Diese Kontrollen werden bei 36 °C für 2-3 Tage inkubiert.

3.3.6.5 Isolierung von DNA aus Hefen

Ein Hefeklon wird in 10 ml YNB-Glukosemedium (-TRP, -URA, -Leu) angeimpft und bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase unter Schütteln bei 25 °C inkubiert (2-3 Tage). Von der Kultur werden 1,5 ml bei 18300 x g bei 4 °C abzentrifugiert und das Medium abdekantiert. Das Pellet wird in 100 µl Hefeaufbruchpuffer resuspendiert und 200 µl, zuvor mit Hefeaufbruchpuffer gewaschene, „acid washed glass beads“ zugegeben. Nach Zugabe von 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wird der Ansatz 2-3 min gevortext und anschließend bei 1830 x g für 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird abgenommen. Anschließend werden 90 µl der wässrigen Phase mit 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 500 µl kaltem Ethanol gemischt und für 30 min bei -80 °C und anschließend bei 20 °C für 20 min inkubiert. Nachdem der Ansatz für 30 min bei

18300 x g abzentrifugiert wurde, wird das Pellet zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wird die DNA in 25 µl A. bidest resuspendiert. Die DNA wird anschließend zur Vereinzelnung der Plasmide in elektrokompente *E. coli* transformiert.

3.4 Zellkultur

Die Zelllinien HEK12, KB, und 293 wuchsen adhären in beschichteten Zellkulturgefäßen bei 37 °C, 5 % CO₂ und dampfgesättigter Atmosphäre. Als Nährmedium diente DMEM-Medium, versetzt mit 10 % FKS, nicht essentiellen Aminosäuren, 1,5 % einer 2 mM L-Glutaminlösung und jeweils 100 µg/ ml den Antibiotika Penicillin und Streptomycin (im Folgenden als DMEM-Vollmedium bezeichnet). Konfluent gewachsene Zellen wurden mit PBS⁻ gewaschen und durch Trypsinbehandlung von der beschichteten Fläche des Zellkulturgefäßes abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in DMEM-Vollmedium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:15 in neue Zellkulturgefäße überführt.

Zur Lagerung von Zellen wurden diese in Einfriermedium (DMEM-Vollmedium mit 20 % FKS und 10 % DMSO) resuspendiert. Die Zellsuspensionen (ca. $5 \cdot 10^6$ Zellen/ ml) wurden in mit Zellstoff isolierten Kryogefäßen bei -80 C schonend eingefroren und nach 12-24 h zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.4.1 Transfektion von Eukaryontenzellen durch Metafectene

Die Transfektion von Eukaryontenzellen erfolgte unter Verwendung des liposomalen Transfektionsreagens Metafectene gemäß den Angaben der Hersteller. 18-24 h vor Transfektionsbeginn wurden 1 bis $2,5 \cdot 10^5$ Zellen in 6-Loch-Zellkulturplatten (ca. 7 cm² Wachstumsfläche) in DMEM-Vollmedium ohne Antibiotika ausgesät. Die Zellen wurden 4-5,5 h mit dem Transfektionsansatz, bestehend aus DMEM-Vollmedium ohne Antibiotika und den DNA-Lipidkomplexen, inkubiert. Durch Austausch des Transfektionsansatzes mit DMEM-Vollmedium wurde die Transfektion anschließend gestoppt.

3.4.2 Herstellung einer induzierbaren Zelllinie mittels T-REx-Systems

3.4.2.1 Prinzip des T-REx-Systems

Das T-REx System ist ein Tetrazyklin reguliertes menschliches Expressionssystem, das die regulatorischen Elemente des *E. coli* Tn10-kodierten Tetrazyklin-Resistenz-Operons beinhaltet (Hillen und Berens, 1994; Hillen *et al.*, 1983). Die Tetrazyklin Regulation des T-REx-Systems basiert auf die Bindung des Tetrazyklins an den Tetrazyklin-Repressor und Derepression der Promotor kontrollierten Expression des zu untersuchenden Gens (Yao *et al.*, 1998). Beim T-REx-System ist die Expression des zu untersuchenden Gens in Abwesenheit von Tetrazyklin reprimiert und in Anwesenheit von Tetrazyklin induziert (Yao *et al.*, 1998). Die eine Hauptkomponente des T-REx-Systems ist ein induzierbares Expressionsplasmid. Die Expression des zu untersuchenden Gens des induzierbaren Expressionsvektors steht unter der Kontrolle des starken humanen CMV-Promotors (cytomegalovirus immediate-early) (Anderson *et al.*, 1989; Boshart *et al.*, 1985; Nelson *et al.*, 1987) in das zwei Kopien des Tetrazyklin-Operators (TetO₂) kloniert wurden, wobei jede TetO₂-Sequenz als Bindestelle für zwei Moleküle des Tetrazyklin-Repressors dient. Die andere Hauptkomponente des T-REx-Systems ist der pcDNA6/TR regulatorische Vektor der hohe Mengen des Tetrazyklin-Repressors (Postle *et al.*, 1984) unter der Kontrolle des humanen CMV-Promotors exprimiert.

In Abwesenheit des Tetrazyklins formt der Tetrazyklin-Repressor ein Homodimer das mit extrem hoher Affinität an jede der TetO₂-Sequenzen des Promotors des induzierbaren Expressionsvektors bindet (Hillen und Berenz, 1994). Die zwei TetO₂-Bindestellen des Promotors des induzierbaren Expressionsvektors dienen als Bindestellen für 4 Moleküle (oder 2 Homodimere) des Tetrazyklin-Repressors. Die Bindung des Tetrazyklin-Repressor Homodimers an die TetO₂-Sequenz reprimiert die Transkription des zu untersuchenden Gens. Bei Zugabe des Tetrazyklins bindet es mit hoher Affinität an jedes der Tetrazyklin-Repressor-Homodimere in einer 1:1 Stöchiometrie und verursacht eine Konformationsänderung des Repressors, wodurch die Bindung an den Tetrazyklin-Operator verhindert wird. Der Tetrazyklin-Repressor:Tetrazyklin-Komplex dissoziiert dann vom Tetrazyklin-Operator und somit wird die Induktion der Transkription des zu untersuchenden Gens ermöglicht.

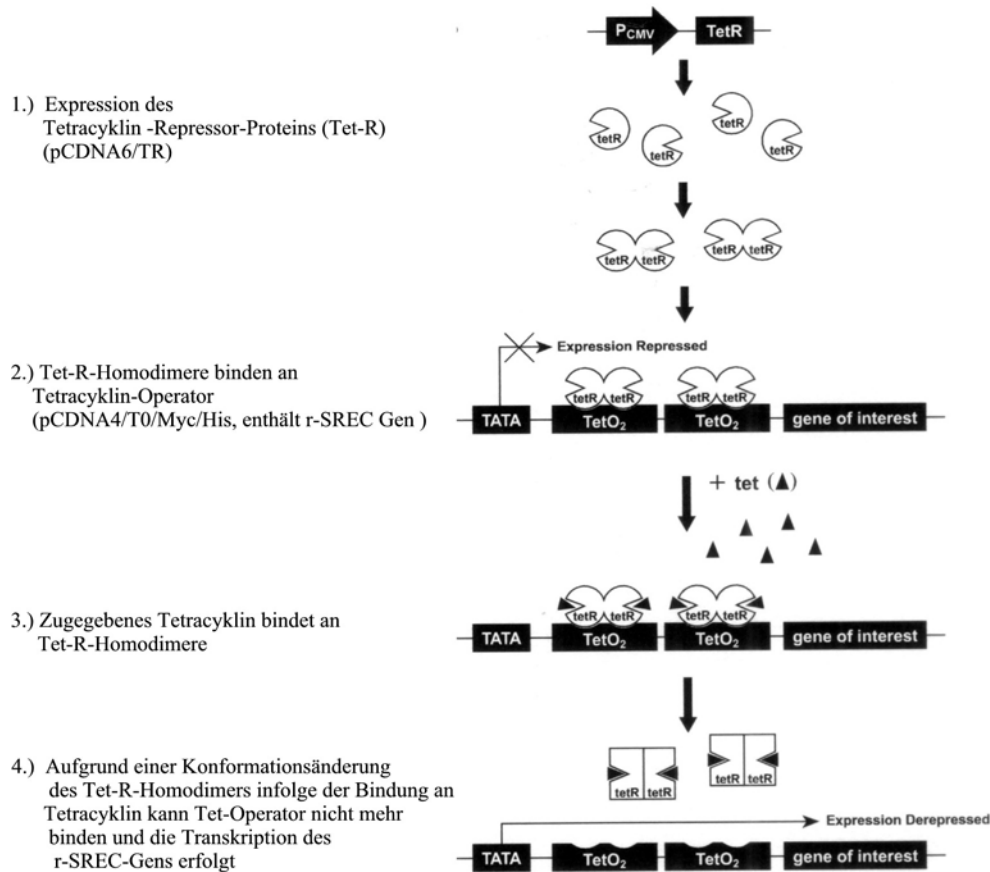


Abb. 8: Prinzip der Regulation der Genexpression des Tetrazyklin induzierbaren T-REx-Systems

3.4.2.2 Herstellung der stabilen r-SREC T-REx HeLa Zelllinie

Als Ausgangszelllinie diente die T-REx-HeLa-Zelllinie, die bereits stabil den Tetrazyklin-Repressor des Plasmid pcDNA6/TR exprimiert. Diese Zelllinie wurde unter Blasticidinselektion (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Medium) kultiviert. Das r-SREC-Gen wurde in das Plasmid pcDNA4/TO/Myc/His inkloniert und durch Sequenzierung das richtige Leseraster überprüft. Es wurden zweimal je $3 \cdot 10^5$ T-REx-HeLa-Zellen auf einer 6-Loch-Zellkulturplatte (ca. 7 cm^2 Wachstumsfläche) ausgesät und über Nacht kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und durch Antibiotika freies Medium ersetzt. Nach Anweisung des Herstellers erfolgte die Transfektion unter Verwendung von 2 μg DNA und 10 μl Metafectene für 5,5 Stunden.

Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion passagiert, unterschiedliche Verdünnungen der Zellsuspension auf 100 mm \varnothing Zellkulturschalen überführt und unter Selektionsdruck (Blasticidin 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Medium und Zeocin 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Medium) kultiviert. Nach ca. 2-3 Wochen wurden Zellfoci mit einem Durchmesser von 2-3 mm mit Hilfe von Klonierungsringsen isoliert, durch Trypsinbehandlung abgelöst und in 24-Loch-

Zellkulturgefäße überführt. Die so gewonnenen Zelllinien wurden weiter kultiviert bis $1 \cdot 10^5$ Zellen auf eine 60 mm \varnothing Zellkulturschalen ausgesät werden konnten. Die Zellen wurden über Nacht inkubiert und am folgenden Tag die Expression des r-SREC-Proteins durch Zugabe von 1 μ g Tetrazyklin/ ml Medium induziert. Von Zellen wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und nach dem Gellauf durch Western-Blot mit gegen das Myc-Epitop des exprimierten r-SREC-Proteins und entsprechendem an alkalische Phosphatase gekoppeltem Sekundärantikörper auf die Expression von r-SREC-Proteins hin untersucht.

3.4.3 Immunfluoreszenzen

Von den zu untersuchenden 293-, Hek12-, KB- oder T-REx-HeLa-Zellen wurden jeweils zwischen $0,5 \cdot 10^5$ und $1 \cdot 10^5$ Zellen in 6-Loch-Zellkulturplatten (ca. 7 cm² Wachstumsfläche) auf Deckgläschen in entsprechendem Medium ohne Antibiotika ausgesät. Nach Inkubation im Brutschrank über Nacht wurden sie mit 2 μ g DNA und 10 μ l Metafectene transfiziert. Die Zellen wurden in 3 % Paraformaldehyd in PBS⁻ für 15 min fixiert und danach dreimal 5 min mit 100 mM Glycine in PBS⁻ gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 0,1 % TritonX-100 in PBS⁻ für 1-4 min permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS⁻ wurden die Zellen für 30 min mit 1 % BSA in PBS inkubiert, um unspezifische Bindestellen der Antikörper abzusättigen. Als nächstes erfolgte die Zugabe der primären Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 bzw. 1:1000 (nach Angabe der Hersteller) mit 1 % BSA in PBS. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurden die Zellen dreimal 10 min in PBS⁻ gewaschen. Alle nachfolgenden Schritte wurden unter lichtvermeidenden Bedingungen durchgeführt. Die sekundären Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:100 in 1 % BSA in PBS auf die Zellen aufgegeben und ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS⁻ wurde zur Anfärbung der Zellkerne Hoechst33342 (1:2000 verdünnt in 1 % BSA in PBS⁻) zugegeben. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen dreimal 5 min in PBS⁻ gewaschen und mit Moviol eingedeckelt.

3.4.4 TUNEL-Assay

Für den TUNEL-Assay wurden $0,75 \cdot 10^5$ r-SREC T-REx-HeLa-Zellen in 6-Loch-Zellkulturplatten (ca. 7 cm² Wachstumsfläche) auf Deckgläschen ausgesät. Die Expression des r-SREC-Proteins wurde durch Zugabe von 1 μ g Tetrazyklin/ ml Medium für die Dauer

von 0 h, 24 h, 48 h, 72 h induziert. Anschließend wurde der TUNEL-Assay nach Vorschrift der Firma Roche durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten Zellen die nach Fixierung und Permeabilisierung für 10 min mit DNaseI (3U/ ml in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mg/ ml BSA) bei Raumtemperatur behandelt wurden, um DNA-Strangbrüche zu induzieren.

Als Negativkontrolle dienten Zellen auf die nur die Markierungs-Lösung aufgebracht wurde. Die Präparate werden mit Moviol eingedeckelt und die Anzahl der apoptotischen Zellen mittels confocaler Lasermikroskopie detektiert.

3.4.5 AnnexinV/ Propidiumiodid-Färbung

Es wurden $0,75 \cdot 10^5$ r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen in 6-Loch-Zellkulturplatten (ca. 7 cm² Wachstumsfläche) auf Deckgläschen ausgesät. Die Expression des r-SREC-Proteins wurde durch Zugabe von 1µg Tetrazyklin/ ml Medium für die Dauer von 0 h, 24 h, 48 h, 72 h induziert. Anschließend wurde die AnnexinV-Propidiumiodid-Färbung nach Vorschrift der Firma Roche durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die durch 2 minütige Inkubation mit 0,1 % Tween in PBS permeabilisiert wurden.

4. Ergebnisse

Zu Beginn meiner Arbeit war über die Struktur des r-SREC-Proteins, seine Lokalisation und seine Funktionen in der Zelle noch sehr wenig bekannt. Isoliert mit Hilfe des SOS-„Two-Hybrid“-Systems nach dem Durchsuchen einer embryonalen Ratten-Hypophysen c-DNA-Bank war es bereits grob charakterisiert worden. GST-„Pull-Down“-Analysen und Co-Präzipitationen mit geeigneten Antikörpern hatten gezeigt, dass das r-SREC-Protein mit E1A-Proteinen von Ad12 physikalisch interagiert und hierfür das aminoternale Ende in Kombination mit der Region CR1 und die Region CR2 notwendig zu sein schien. Auch gab es erste Hinweise darauf, das r-SREC in Cytoplasma und nicht im Kern lokalisiert ist.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es daher zum einen, die Struktur und Lokalisation in der Zelle, sowie die Interaktion von r-SREC mit E1A-Proteinen von Ad2 und Ad12 genauer zu charakterisieren und zum anderen Hinweise auf eine mögliche Funktion des r-SREC-Proteins zu erhalten.

Zwei wichtige Voraussetzungen für die Durchführung der Experimente waren dabei: 1) die Konstruktion von r-SREC-Mutanten (Deletionsmutanten) und 2) die Konstruktion einer Zelllinie (T-REx-HeLa-Zelllinie), in der die Expression eines exogen eingebrachten r-SREC-Gens induziert werden kann.

4.1 Etablierung einer HeLa-Zelllinie mit einer durch Tetrazyklin induzierbaren r-SREC-Proteinexpression

Bisherige Experimente in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass sich das r-SREC-Protein in transienten Expressionsanalysen nicht immer in ausreichender Menge exprimieren ließ. Konstante Expressionsbedingungen sind jedoch Voraussetzung, um aussagekräftige Daten bei den *in vivo* Interaktionsstudien der r-SREC- und E1A-Proteine, sowie in Genchip-Analysen zu erhalten. Daher wurde zunächst eine stabil transformierte Zelllinie etabliert, bei der sich die Expression des r-SREC-Proteins induzieren ließ (T-REx-HeLa-Zelllinie).

Das verwendete T-REx-System stellt ein Tetrazyklin-reguliertes menschliches Expressionssystem dar, das die regulatorischen Elemente des *E. coli* Tn10-kodierten Tetrazyklin-Resistenz-Operons beinhaltet (Hillen und Berens, 1994; Hillen *et al.*, 1983). Die Tetrazyklin-Regulation des T-REx-Systems basiert auf der Bindung des Tetrazyklins an den Tetrazyklin-Repressor und der De-Repression der Promotor kontrollierten Expression des zu untersuchenden Gens (Yao *et al.*, 1998).

T-REx-HeLa-Zellen, die bereits das Expressionsplasmid pCDNA6/TR enthielten, von dem ein an den Tetrazyklin-Promotor bindender Repressor exprimiert wird, wurden mit dem Plasmid pcDNA4/T0/Myc/His, in das zuvor das r-SREC-Gen einkloniert worden war, transfiziert und eine Reihe von Einzelklonen (über 30 Einzelklone) selektiert (s. 3.2.3). Zunächst sollte durch PCR-Analysen der genomischen DNA, von 18 der isolierten Klone, unter Verwendung geeigneter Primer, die Integration des Expressionsplasmids pCDNA4/T0/Myc/His-r-SREC in das Genom überprüft werden (s. Abb. 9).

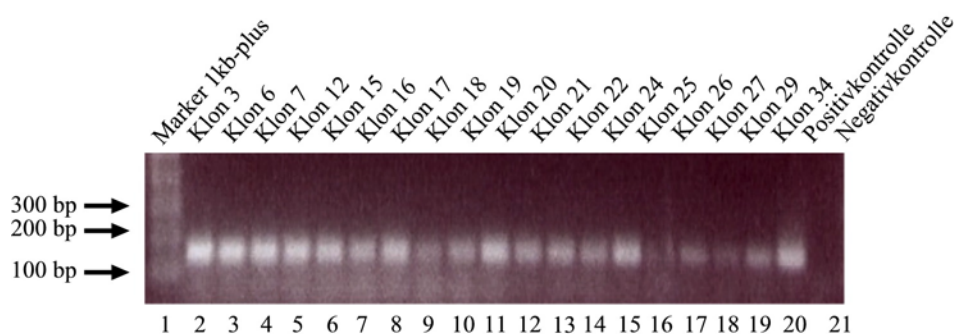


Abb. 9: Überprüfung der Integration des Konstruktes r-SREC pcDNA4/T0/Myc/His mittels PCR. Um mit Hilfe von PCR die Integration des Konstruktes pcDNA4/T0/Myc/His-r-SREC in das Genom der Zellen zu überprüfen, wurde genomische DNA isoliert und eine PCR mit spezifischen Primern durchgeführt.

Spur 1: 1 kb-plus Marker; Spur 2-19: isolierte Klone der r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen; Spur 20: Positivkontrolle mit Konstrukt pcDNA4/T0/Myc/His-r-SREC; Spur 21: Kontrollreaktion ohne DNA-Matrize

Die in Spur 20 aufgetragene Positivkontrolle zeigt, wie erwartet, eine Bande mit einer Größe von ca. 150 bp. Die Spuren 2-19, die die Analyse der aus einzelnen isolierten r-SREC-T-REx-HeLa-Klonen isolierten genomischen DNA zeigen, weisen Banden identischer Größe in unterschiedlicher Intensität auf.

Um die Unabhängigkeit der transformierten r-SREC-T-REx-HeLa-Klone hinsichtlich der Integration des r-SREC-Gens in das Genom der Zellen sicher zu stellen, wurden Southern-Blot Analysen durchgeführt. Die genomische DNA der einzelnen Zellklone wurde vor der Auftrennung durch Agarose-Gelelektrophorese mit der Restriktionsendonuclease *EcoRV* vollständig verdaut. Da das r-SREC-Gen selbst keine *EcoRV*-Schnittstelle trägt und nur eine *EcoRV* Restriktionsstelle im Expressionsvektor pCDNA4/T0/Myc/His selbst vorliegt, ist bei einer Integration des pCDNA4/T0/Myc/His-r-SREC Plasmids in das Genom der Zelle, eine Bande zu erwarten. Die Abb. 10 zeigt das Fluorogramm des Southern-Blots der DNA von 16 r-SREC-T-REx-HeLa-Klonen nach Hybridisierung mit der DNA-Sonde. Bei dem r-SREC-T-REx-HeLa-Klon 7 (Spur 2), -Klon 15 (Spur 13) und -Klon 26 (Spur 7) konnte eine Integration des r-SREC-Expressionsvektors nachgewiesen werden, die aufgrund des unterschiedlichen Laufverhaltens im Agarosegel von unabhängigen Transformationsprozessen stammt (s. Abb. 10). Warum bei den übrigen untersuchten Klonen keine Hybridisierungssignale zu detektieren waren, könnte dadurch zu erklären sein, dass die den r-SREC-Expressionsvektor tragenden *EcoRV*-DNA-Fragmente des Genoms nach Restriktionsverdau aufgrund ihrer Größe erst gar nicht in das Agarosegel hineingelaufen sind. Es wäre auch möglich, dass eine integrierte Kopie des Expressionsvektors an die Grenze des Auflösungsvermögens der Southern-Blots stößt. Die Tatsache, dass die Hybridisierungssignale zumindest für die Klone 7, 15 und 26 so stark sind könnte auf eine „tandemartige“ Integration mehrerer Expressionsplasmide hintereinander schließen lassen. Solch eine Form von Integration von Vektoren in das Zellgenom wird häufiger beobachtet. Die als Kontrolle aufgetragene DNA aus nicht transfizierten T-REx-HeLa-Zellen (Spur 18) zeigt keine unspezifische Bindung der Sonde.

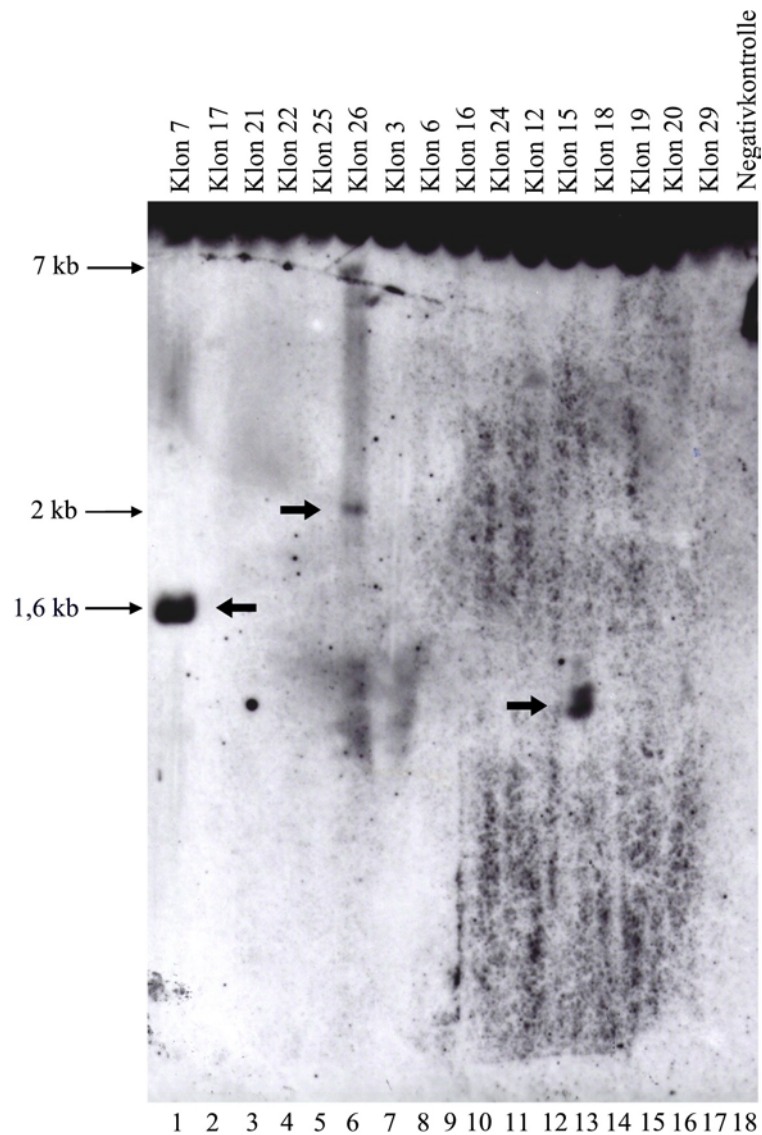


Abb. 10: Untersuchung des Integrationsmusters von r-SREC in das Genom der transformierten T-REx-HeLa-Zellen. Southern-Blot Analysen von genomischer DNA der jeweiligen Zellklone. 20 μ g (Klone 12, 15, 18, 19, 20, 29), 25 μ g (Klone 3, 6, 34) oder 30 μ g (Klone 7, 17, 21, 22, 25, 26) *EcoRV* restringierte genomische DNA jedes Zellklons wurden auf ein 4 % Agarosegel aufgetrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran mittels Kapillarblot geblottet. Die Membranen wurden mit einer mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Sonde hybridisiert. Da *EcoRV* nicht im r-SREC-Gen schneidet, repräsentiert eine Bande eine Integration in das Genom der T-REx-HeLa Zellen. Als Positivkontrolle dient *EcoRV* restringierte Plasmid-DNA des r-SREC pcDNA4/T0/Myc/His Konstruktes (nicht gezeigt). Als Negativkontrolle (Spur 18) diente *EcoRV* restringierte DNA von untransformierten T-REx-HeLa-Zellen.

Um sicherzustellen, dass die generierte r-SREC-T-REx-HeLa-Zelllinie das r-SREC-Protein induzierbar exprimiert, wurde die Expression des r-SREC-Proteins im Western-Blot analysiert. Gesamtzellextrakte der T-REx-HeLa-Klone wurden auf 12% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membranen geblottet und das r-SREC/Myc/His-Fusionsprotein unter Verwendung eines anti-Myc Antikörpers im Western-Blot detektiert. Die Abb. 11 zeigt beispielhaft die Expression von r-SREC und seine Induzierbarkeit durch Tetrazyklin für die isolierten r-SREC-T-REx-HeLa-Zell-Klone 7 und

15. Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass sich r-SREC in den Klonen 7 und 15 gut induzieren lässt und zum anderen, dass keine Expression der r-SREC-Proteins in nicht induzierten Zellen nachweisbar ist.

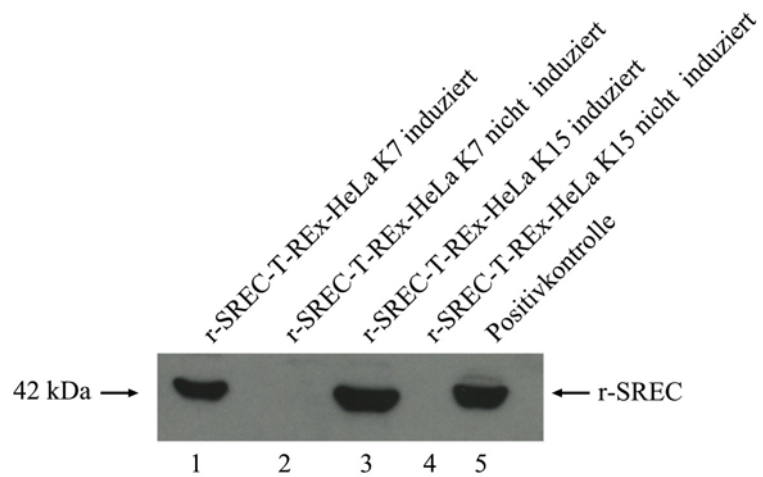


Abb. 11: Western-Blot der Gesamtzellextrakte der induzierten und nicht induzierten r-SREC-T-REx-HeLa-Klone. Von den r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen Klon 7 und 15 wurden Zellen ausgesät und ein Teil der Zellen mit 1 μ g Tetrazyklin/ ml Zellkulturmedium induziert. 70 μ g Gesamtzellextrakt wurden auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Elektroblothing auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Die Detektion erfolgte unter Verwendung eines anti-Myc Antikörpers gegen das r-SREC-Myc-Fusionsprotein mit entsprechendem HPO-konjugierten sekundären Antikörper und einem Chemolumineszenz-Substrat.

4.2 Konstruktion von Deletionsmutanten des r-SREC-Gens

Die Deletionsmutanten wurden durch die Amplifikation entsprechender r-SREC-DNA-Abschnitte mit PCR unter Verwendung von jeweils spezifischen Primern und des „Taq-Master Kits“ (Firma Eppendorf) und anschließender Klonierung der amplifizierten r-SREC-Sequenzen in das Plasmid pcDNA3.1/Myc/His hergestellt. Wie die Abb. 12 zeigt, wurden bei den Mutanten jeweils einzelne oder mehrere putative Transmembrandomänen und/oder die DHHC-Region des r-SREC-Proteins deletiert (entsprechend der noch vorhandenen Aminosäuren bezeichnet). Nach Prüfung der korrekten Nukleotidsequenz wurden diese in den verschiedenen Mutationsanalysen eingesetzt.

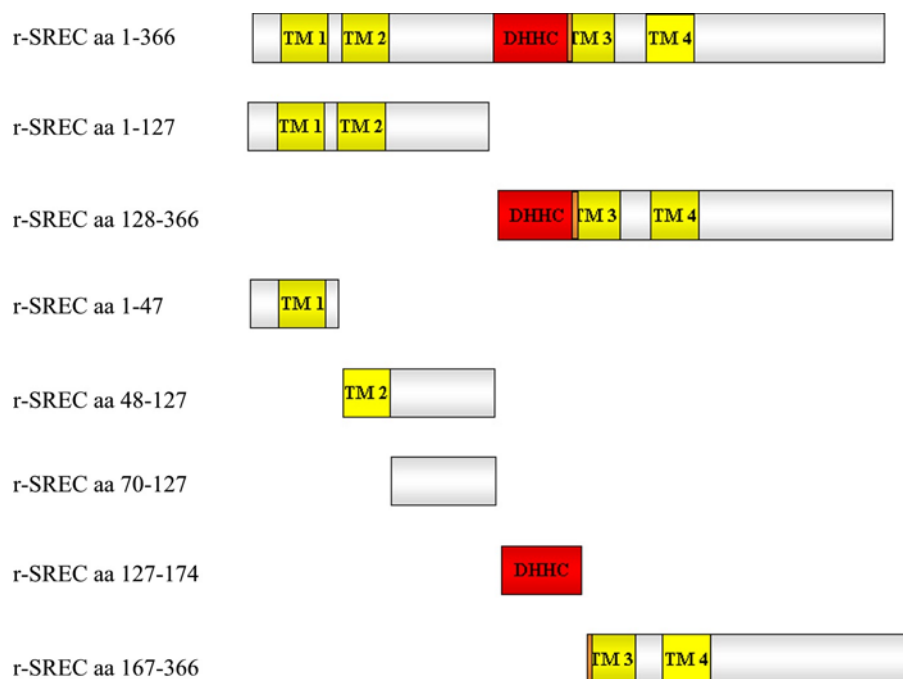


Abb. 12: Schematische Darstellung von r-SREC und den verschiedenen r-SREC-Mutanten. Das r-SREC-Protein beinhaltet vier putative Transmembrandomänen (gelb markiert), sowie eine cysteinreiche DHHC-Zinkfinger-Domäne (rot markiert).

Neben dem Einsatz der r-SREC-Mutanten zur Identifizierung von Domänen des r-SREC-Proteins, die für die Bindung an E1A essentiell sind, sollten diese auch bei Untersuchungen zur Lokalisation des r-SREC-Proteins in der Zelle eingesetzt werden.

Die in den Protein/Protein-Interaktionsstudien eingesetzten GST-E1A-WT und GST-E1A-Mutantenproteine, die in unserer Arbeitsgruppe bereits vorlagen, sind in der Abb. 13 dargestellt.

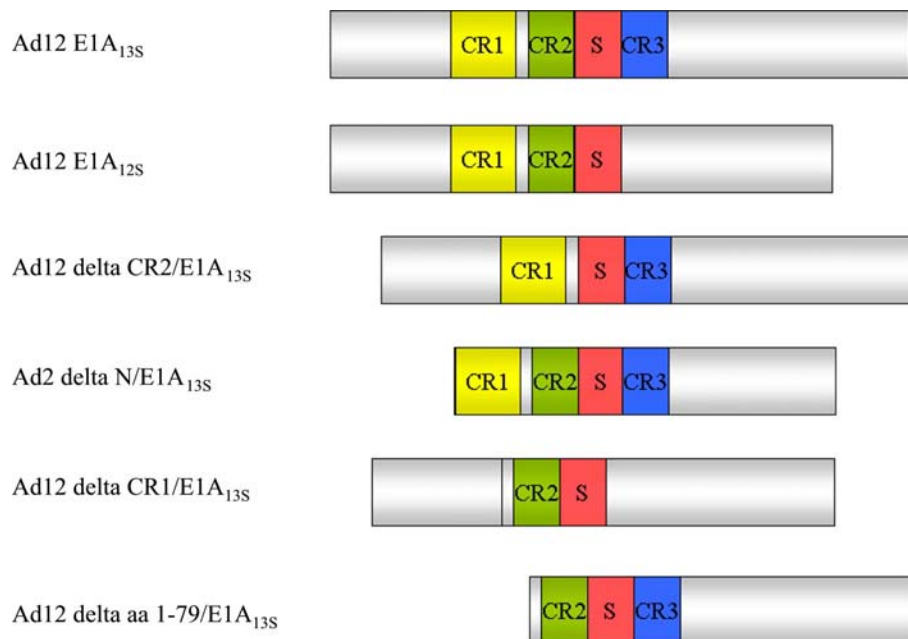


Abb. 13: Darstellung der Struktur der verwendeten E1A-Mutanten. Das E1A-Protein beinhaltet drei konservierte Domänen (CR1 gelb markiert, CR2 grün markiert, CR3 blau markiert), sowie die sog. Spacer-Region (rot markiert).

4.3 Charakterisierung der Proteininteraktionsdomänen von Ad12 E1A13S und r-SREC mittels GST-„Pull-Down“-Experimenten

Zur Identifikation von Proteindomänen des r-SREC-Proteins, die für die Bindung an das E1A_{13S}-Protein essentiell sind wurden Protein-Protein-Interaktionsstudien mit [³⁵S]-markiertem *in vitro* transkribierten/translatierten r-SREC-Mutanten und GST-E1A-WT-Fusionsproteinen bzw. GST-E1A-Fusionsproteinmutanten durchgeführt (s. Abb. 12 und Abb. 13). Die Proteindomänen, die von Seiten des E1A-Proteins für die Bindung an das r-SREC Protein essentiell sind, waren bereits zuvor in unserem Labor durch Protein/Protein-Interaktionsstudien identifiziert worden. Bei dieser Untersuchung waren GST-E1A-WT-Fusionsprotein oder die entsprechenden GST-E1A-Fusionsproteinmutanten an Gluthationsepharose immobilisiert und mit *in vitro* transkribierten/translatiertem [³⁵S]-radioaktiv-markiertem r-SREC-Protein inkubiert worden. Interagierende Proteine wurden isoliert, 12 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Fluorographie detektiert. Die wichtigsten Ergebnisse dieses Experiments sind in der Abb. 14 dargestellt. Das r-SREC Protein ist sowohl in der Lage an das Ad12 E1A_{13S}- (Spur 4), als auch an das Ad12E1A_{12S}-Protein binden (Spur 5). Die Deletion der CR2 des E1A-Proteins führt zu einer Abnahme des Bindungspotentials, während die Deletionen des N-Terminus (aa 1-23) sowie des N-Terminus plus der Region CR1 (aa 1- 79) zu keiner Interaktion mit dem r-SREC-Protein mehr zeigen.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die konservierte Region 2 (CR2) und der N-Terminus der E1A-Proteine für die Bindung an das r-SREC-Protein verantwortlich sind.

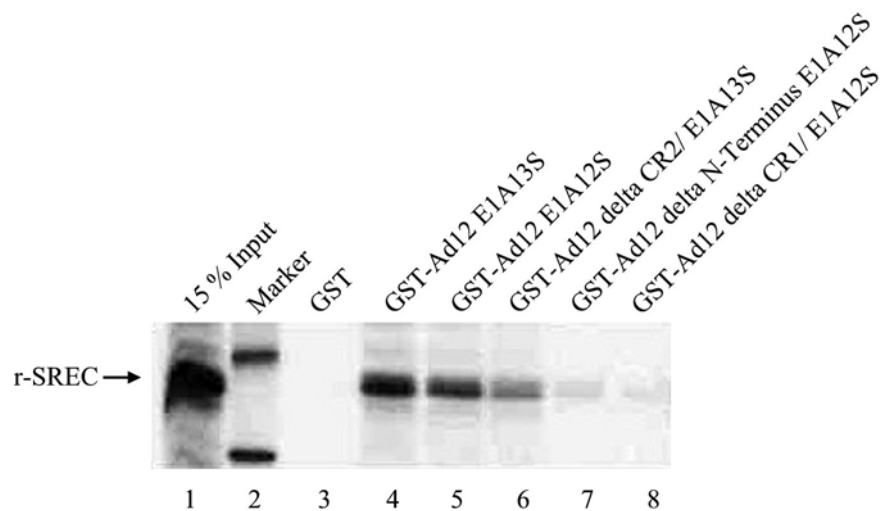


Abb. 14: Das r-SREC-Protein interagieren mit Ad12E1A *in vitro*. In den GST Fusionsprotein-Interaktionsstudien wurden 200.000 CPM [^{35}S]-markiertes *in vitro* transkribiertes/translatiertes r-SREC-Protein und GST-E1A_{13S} bzw. GST-E1A_{13S}-Fusionsproteinmutanten, sowie GST-Fusionsprotein als Negativkontrolle, wie angegeben, eingesetzt. Die interagierenden Proteine wurden eluiert, auf einem 12%-SDS-Polyacrylamidgel gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Fluorographie detektiert. Als Kontrolle der *in vitro* Translation wurden 12 %iges der eingesetzten Menge von [^{35}S]-r-SREC-Volllängenprotein aufgetragen (Spur1); (Spur2) Größenstandard (S. Kullmann, unveröffentlicht).

Die Methode wurde nun verwendet, um die Proteindomänen des r-SREC-Proteins zu identifizieren, die für die Bindung an E1A verantwortlich sind. Für diese Protein/Protein Interaktionsstudien wurde nur das GST-E1A_{13S}-Fusionsprotein, das nachweislich an das r-SREC-Protein bindet, sowie eine GST-E1A-Fusionsproteinmutante, die auf Grund der Deletion des N-Terminus plus der Region CR1 (aa 1- 79) nicht mehr mit dem r-SREC-Protein interagiert, verwendet. Die Bestimmung der r-SREC-Proteindomänen, die für die Bindung an die E1A-Proteine verantwortlich sind, gestaltete sich, trotz Verwendung der gleichen Methode (GST-„Pull-Down“-Experimente) sehr schwierig, was möglicherweise in der membrangebundenen Struktur des r-SREC-Proteins begründet sein könnte, sowie in der Anzahl der Aminosäuren die durch [^{35}S]-radioaktiv-markiert werden konnten. Trotz einer Reihe von Modifikationen der Methode (z.B. weniger stringentes Waschen zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine) führten die Untersuchungen mit den übrigen r-SREC-Mutanten zu keinen eindeutigen Ergebnissen.

Bei dem in der Abb. 15 dargestellten Experiment wurden das r-SREC-Volllängenprotein (aa 1-366), sowie die beiden r-SREC-Mutantenproteine r-SREC aa 1-127 sowie r-SREC aa 128-366 *in vitro* transkribiert/translatiert, mit [^{35}S]-radioaktiv-markiert und Protein/Protein-Interaktionsstudien mit den beiden oben beschriebenen GST-

Fusionsproteinen wie schon bei dem zuvor beschriebenen Experiment durchgeführt. Es zeigte sich, dass sowohl die aminoterminal gelegenen r-SREC-Sequenzen (r-SREC aa 1-127) als auch die carboxyterminale Hälfte des r-SREC-Proteins (aa 128-366), wenn auch mit unterschiedlicher Intensität, an das Ad12 E1A_{13S}-Protein binden können (siehe Abb. 15). In dieser Interaktionsstudie konnte der Aminoterminus in Kombination mit der Region CR1 (aa 1-79) als essentielle Domäne für die Bindung von r-SREC an E1A bestätigt werden.

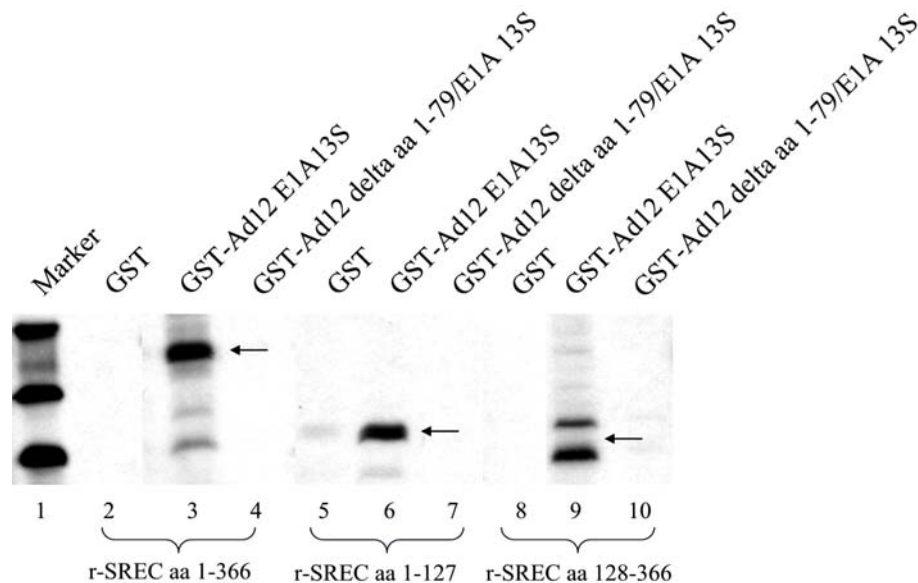


Abb. 15: Das r-SREC-Protein und r-SREC-Proteinmutanten interagieren mit Ad12E1A *in vitro*. In den GST Fusionsprotein-Interaktionsstudien wurden 200.000 CPM [³⁵S]-markiertes *in vitro* transkribierten/translatierten r-SREC-Protein bzw. r-SREC-Proteinmutanten und GST-E1A_{13S} bzw. GST-E1A_{13S}-Fusionsproteinmutanten, sowie GST-Fusionsprotein als Negativkontrolle, wie angegeben eingesetzt. Die interagierenden Proteine wurden aufgereinigt, eluiert, auf einem 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Fluorographie detektiert (r-SREC aa 1-366 (Spuren 2-4); r-SREC aa 1-127 (Spuren 5-7) r-SREC aa 128-366 (Spuren 8-10)). Als Kontrolle der *in vitro* Translation wurden 10% der eingesetzten Menge von [³⁵S]-r-SREC Volllängenprotein aufgetragen (hier nicht gezeigt). Größenstandard (Spur 2).

4.4 Untersuchungen zur Lokalisation des r-SREC-Proteins

Die Lokalisation von Proteinen gibt in vielen Fällen erste Hinweise auf die Funktion eines Proteins in der Zelle. Um die zelluläre Lokalisation des Proteins, vor allem den Einfluss der Deletion bestimmter Bereiche auf die Lokalisation des r-SREC-Proteins in der Zelle, zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzuntersuchungen durchgeführt. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Bindung von E1A zu einer Lokalisationsänderung führt. Daher wurde zunächst die Lokalisation von r-SREC und mögliche Lokalisationsänderungen von r-SREC-Mutanten, denen durch Deletionen bestimmter Domänen des Proteins entfernt wurden (s. Abb. 11), bestimmt. Für diese Experimente wurden sowohl KB-Zellen und die T-REx-

HeLa-Zellen, als auch E1A-Proteine exprimierende T-REx-HeLa-Zellen und Ad12- (HEK-12) und Ad2-transformierte Zellen (293) verwendet.

Die in die Expressionsvektoren inklonierten r-SREC-DNA-Sequenzen, die als Fusionsproteine mit einem C-terminalen Myc- und His-Epitop exprimiert werden, wurden in die Zellen transfiziert bzw. die Expression des r-SREC-Proteins induziert. 48 Stunden nach Transfektion bzw. 24 h nach Induktion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit entsprechenden primären und sekundären Antikörpern inkubiert. Das r-SREC-Protein, sowie die r-SREC-Proteinmutanten wurden durch einen gegen das Myc-Epitop gerichteten primären und einen sekundären Cy3-gekoppelten Antikörper (rote Färbung) visualisiert. Außerdem erfolgte eine Anfärbung spezifischer Cytoplasmastrukturen durch anti-Aktin Antikörper und sekundären Alexa488-gekoppelten Sekundärantikörper (grüne Färbung), sowie eine Anfärbung des Zellkerns erfolgte mit Hoechst33342 (Blau). Die Lokalisation der einzelnen Strukturen wurde dann mittels der confocalen Lasermikroskopie analysiert

4.4.1 Lokalisation von r-SREC-WT und r-SREC-Mutanten in KB- und T-REx-HeLa-Zellen

Zunächst wurde die Lokalisation von r-SREC und den r-SREC Mutanten in KB- und den T-REx-HeLa-Zellen untersucht. Die Abb. 16 zeigt das Ergebnis der Immunfluoreszenzanalyse von mit einem Leervektor transfizierten (Negativkontrolle) und von das r-SREC-Volllängenprotein (r-SREC aa 1-366) exprimierenden KB-Zellen. Bei den mit dem Volllängenprotein transfizierten Zellen sind neben der Anfärbung des Aktincytoskeletts (Grün) und des Zellkerns (Blau) auch das rot angefärbte r-SREC-WT-Protein sichtbar; es liegt verteilt über das gesamte Cytoplasma vor. Die Überlagerung der einzelnen Bilder (D) der Anfärbungen des Aktincytoskeletts, des Zellkerns und der Anfärbung des r-SREC-Proteins, zeigt deutlich, dass die Lokalisation des r-SREC-Proteins mit der des Aktincytoskeletts übereinstimmt. Immunfluoreszenzen von KB-Zellen, die nur die ersten 1-127 aa des r-SREC-Proteins exprimieren, zeigen ein dem r-SREC-Volllängenprotein vergleichbares Verteilungsmuster des Mutantenproteins (s. Abb. 16). Bei der Mutante r-SREC aa 128-366 hingegen ist das Protein zum großen Teil in Zellkernnähe deutlich konzentriert nachweisbar. Bei der Mutante r-SREC aa 1-47 und r-SREC aa 48-127 liegt in beiden Fällen das jeweilige Mutantenprotein in sehr kleinen abgegrenzten Bereichen vor, die über das Cytoplasma verteilt sind (s. Abb. 16). Das Protein r-SREC aa 70-127, das weder eine putative Transmembranregion noch die DHHC-Domäne besitzt, liegt über die gesamte Zelle hinweg verteilt vor (s. Abb. 17). Eine ähnliche Lokalisation wurde auch für die Proteine der

Mutanten r-SREC aa 128-174 und r-SREC aa 167-366 nachgewiesen, wenn auch bei der Betrachtung der Überlagerung der Anfärbungen, eine leichte Konzentration im Zellkern-nahen Bereich zu detektieren war. Diese Konzentration von r-SREC im Zellkern-nahen Bereich ist wesentlich schwächer als bei der Proteinmutante r-SREC aa 128-366 (s. Abb. 16).

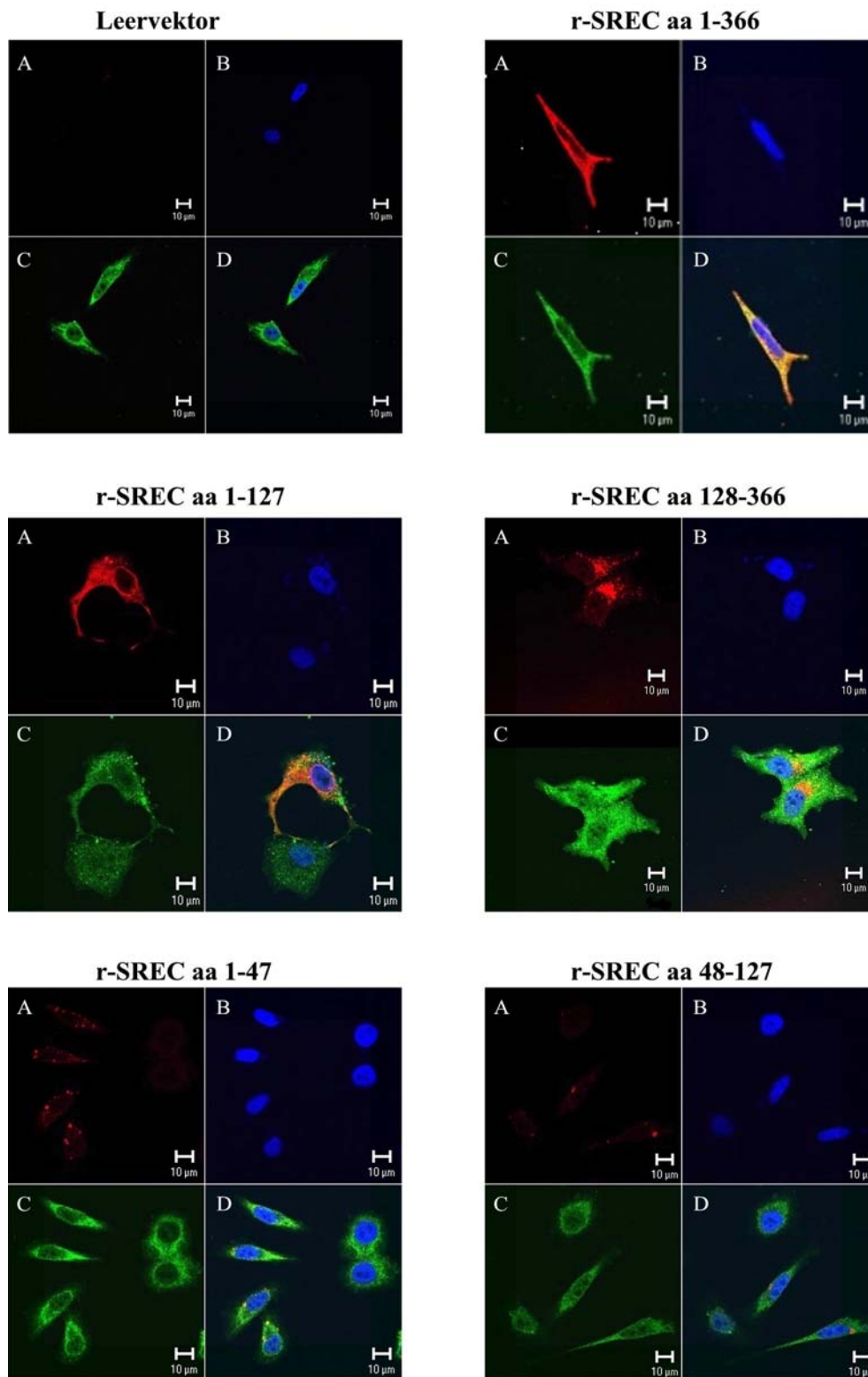


Abb. 16: Zelluläre Lokalisation r-SREC-WT-Proteins und der r-SREC-Mutantenproteine r-SREC aa 1-127, r-SREC aa 128-366, r-SREC aa 1-47 und r-SREC aa 48-127 in KB-Zellen KB-Zellen wurden mit den verschiedenen Expressionsvektoren für das r-SREC-Myc-Fusionsprotein bzw. r-SREC-Myc-Fusionsproteinmutanten transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die intrazelluläre Verteilung des r-SREC-Myc-Fusionsproteins bzw. der r-SREC-Myc-Fusionsproteinmutante (A, rot), des Aktin-Zykoskeletts (C, grün) mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen bestimmt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (B, blau) angefärbt. (D) Überlagerung der einzelnen Bilder.

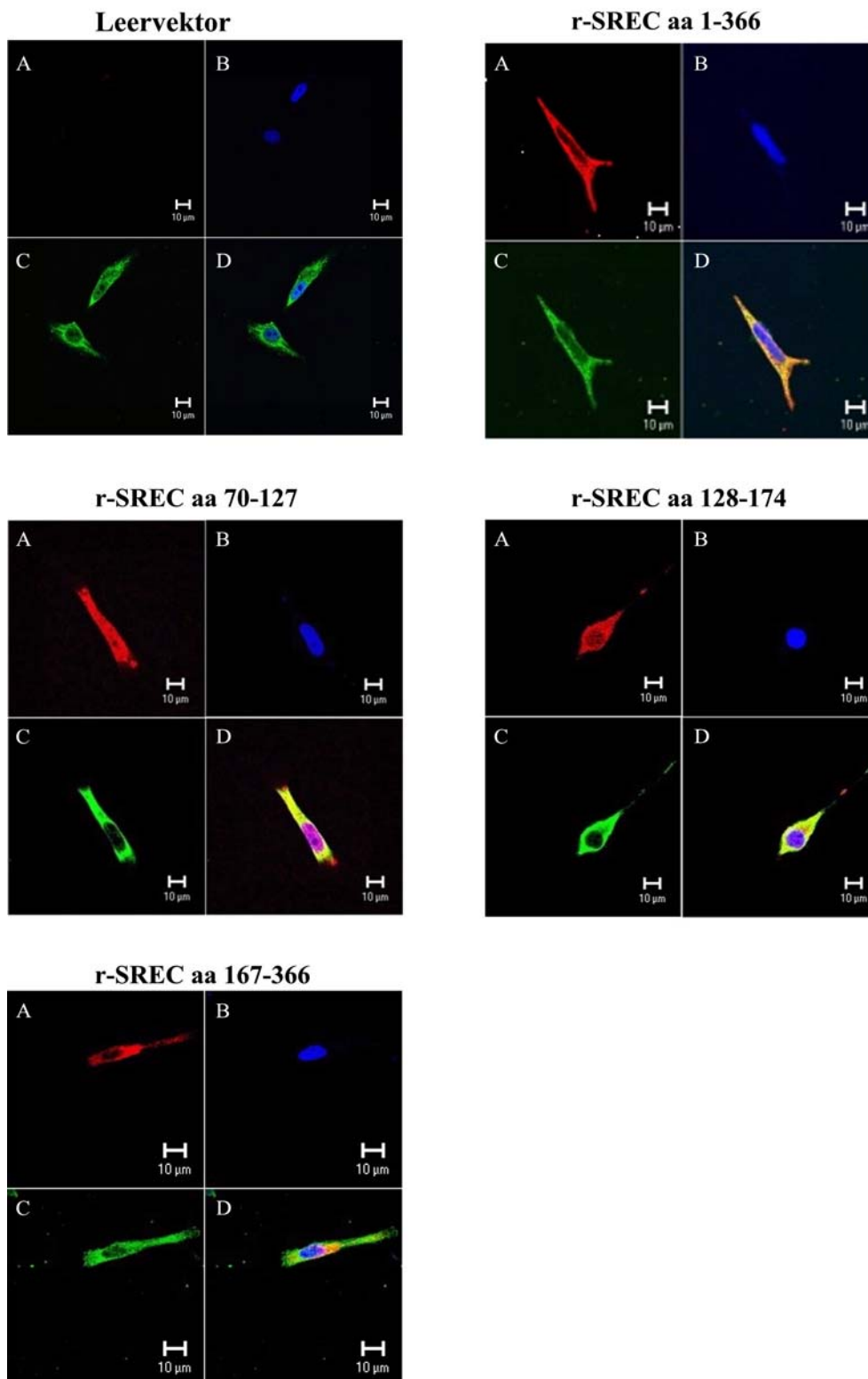


Abb. 17: Zelluläre Lokalisation der Mutanten r-SREC aa 70-127, r-SREC aa 128-174 und r-SREC aa 167-366 in KB-Zellen. KB-Zellen wurden mit den verschiedenen Expressionsvektoren für das r-SREC-Myc-Fusionsprotein bzw. r-SREC-Myc-Fusionsproteinmutanten transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die intrazelluläre Verteilung des r-SREC-Myc-Fusionsproteins bzw. der r-SREC-Myc-Fusionsproteinmutante (A, rot), des Aktin-Zytoskeletts (C, grün) mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen bestimmt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (B, blau) angefärbt. (D) Überlagerung der einzelnen Bilder.

In induzierten r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen liegt, wie bereits in KB-Zellen beobachtet, das r-SREC-Protein über das gesamte Cytoplasma verteilt vor. Die Abb. 18 zeigt die Visualisierung der bereits beschriebenen Anfärbungen (Zellkerne (blau); Aktin (grün); r-SREC (rot)) mit der confocalen Lasermikroskopie der r-SREC-T-REx-HeLa Klone K7, K15 und K26, bei denen im Southern-Blot eine unabhängige Transformation von r-SREC in das Genom nachgewiesen wurde. Erwähnenswert ist vielleicht auch hier, dass eine leichte Konzentration von r-SREC nahe dem Zellkern zu detektieren ist. Sehr eindeutig zeigt sich, dass nur in den Fällen, in denen die Expression des r-SREC-Proteins durch Inkubation der Zellen mit Tetrazyklin (für 24 h) induziert wurde, das exogene r-SREC-Protein nachgewiesen werden kann.

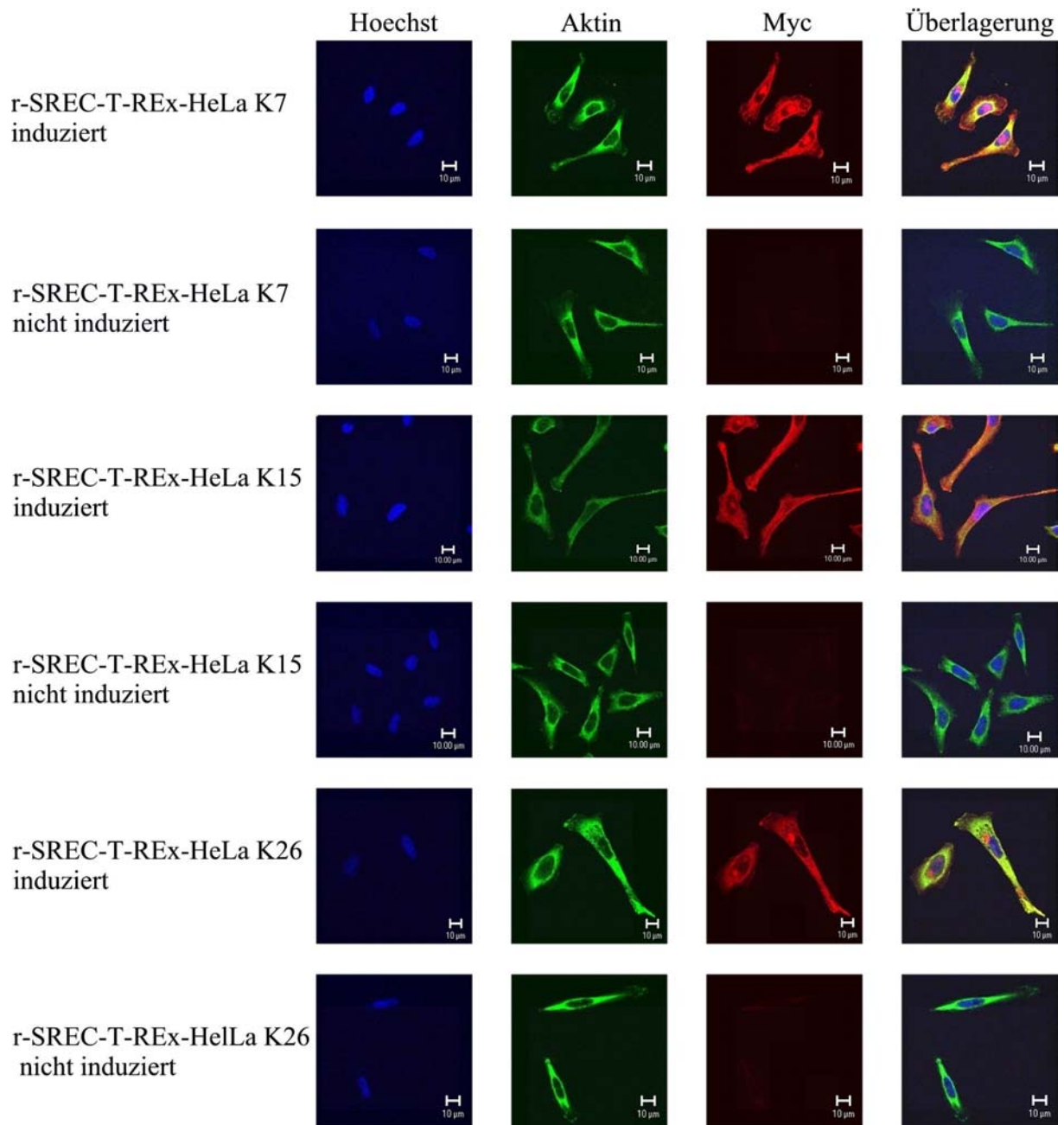


Abb. 18: Das r-SREC Protein ist in induzierten r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen im Cytoplasma detektierbar. KB-Zellen wurden mit den verschiedenen Expressionsvektoren für das r-SREC-Myc-Fusionsprotein bzw. r-SREC-Myc-Fusionsproteinmutanten transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die intrazelluläre Verteilung des r-SREC-Myc-Fusionsproteins bzw. der r-SREC-Myc-Fusionsproteinmutante (A, rot), des Aktin-Zytoskeletts (C, grün) mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen bestimmt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (B, blau) angefärbt. (D) Überlagerung der einzelnen Bilder.

4.4.2 Einfluss adenoviraler E1A-Proteine auf die Lokalisation des r-SREC-Proteins

Um zu überprüfen, ob E1A-Proteine/Funktionen die Lokalisation von r-SREC in den Zellen verändert, wurde die Lokalisation von r-SREC in mit einem E1A-Proteine exprimierenden Plasmid transfizierten T-REx-HeLa-Zellen, sowie in Ad12-transformierten menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK-12) und Ad2-transformierten embryonalen Mauszellen (293) Zellen analysiert. In Ad12-transformierten HEK-12- und Ad2-transformierten 293-Zellen war keine Änderung der zuvor in der KB-Zellen nachgewiesenen Lokalisation des r-SREC Proteins, sowie der r-SREC Proteinmutanten - exemplarisch für das Volllängenprotein in Abb. 19 bzw. Abb. 20 gezeigt - detektierbar. In r-SREC exprimierenden r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen (siehe Abb. 21), die zusätzlich mit einem Expressionsvektor transfiziert wurden, der das Ad12 E1A_{13S}-Protein als Fusionsprotein mit einem Flag-Epitop exprimiert, konnte unter Verwendung geeigneter Antikörper ebenfalls keine Änderung der cytoplasmatischen Lokalisation des r-SREC-Proteins in Gegenwart von E1A-Proteinen beobachtet werden.

Hieraus kann man schließen, dass die Bindung des E1A-Proteins an r-SREC zu keiner sichtbaren Veränderung der Lokalisation des r-SREC-Proteins führt. In anderen Fällen, z.B. der Bindung der regulatorischen Untereinheit RII α der Protein Kinase A (PKA) mit dem E1A_{12S}-Protein führt diese Bindung zu einer Translokation der regulatorischen RII α -Untereinheit in den Zellkern (Fax *et al.* 2001).

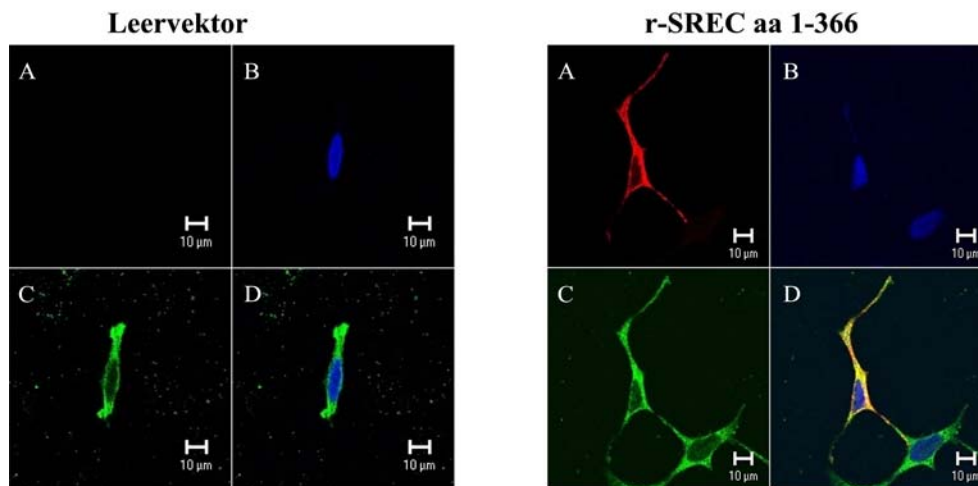


Abb. 19: Zelluläre Lokalisation von r-SREC-WT in HEK12-Zellen. HEK12-Zellen wurden mit den verschiedenen Expressionsvektoren für das r-SREC-Myc-Fusionsprotein transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die intrazelluläre Verteilung des r-SREC-Myc-Fusionsproteins bzw. der r-SREC-Myc-Fusionsproteinmutante (A, rot), des Aktin-Zytoskeletts (C, grün) mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen bestimmt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (B, blau) angefärbt. (D) Überlagerung der einzelnen Bilder.

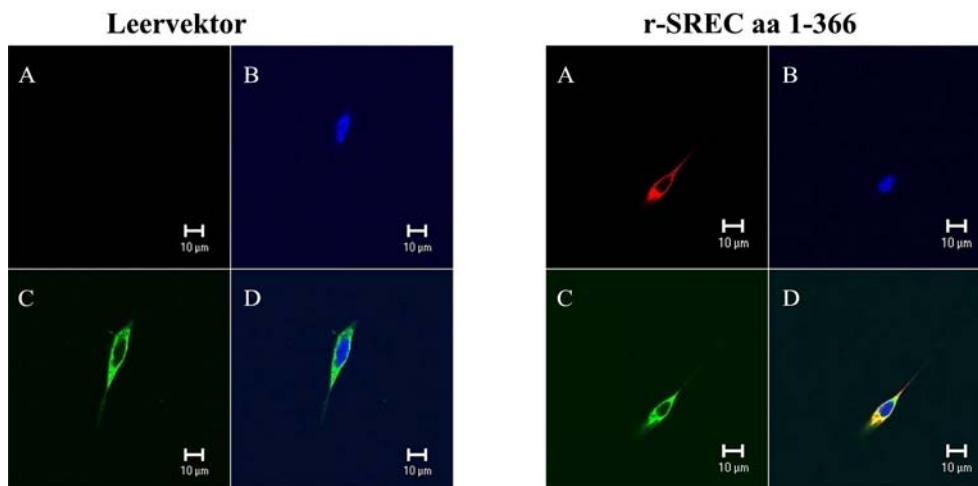


Abb. 20: Zelluläre Lokalisation des r-SREC-WT-Proteins in 293-Zellen. 293-Zellen wurden mit den verschiedenen Expressionsvektoren für das r-SREC-Myc-Fusionsprotein transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die intrazelluläre Verteilung des r-SREC-Myc-Fusionsproteins bzw. der r-SREC-Myc-Fusionsproteinmutante (A, rot), des Aktin-Zytoskeletts (C, grün) mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen bestimmt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (B, blau) angefärbt. (D) Überlagerung der einzelnen Bilder.

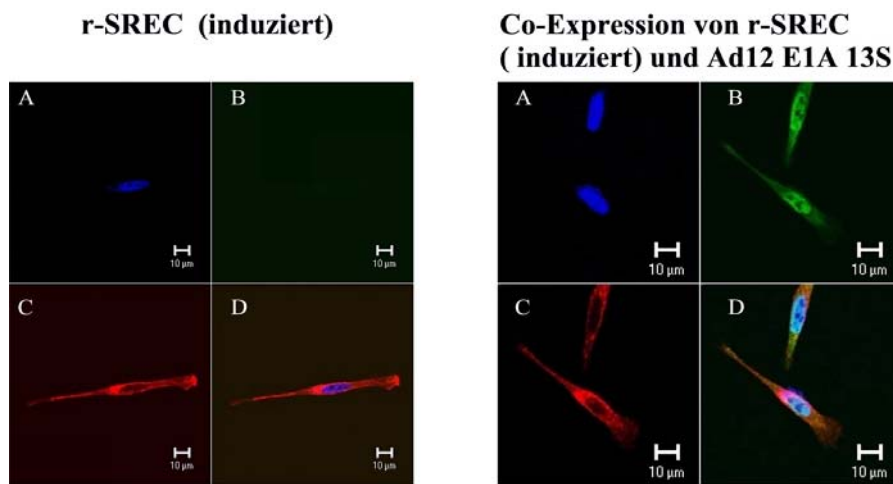


Abb. 21: Das Protein r-SREC ist in Ad12 E1A_{13S} transformierten Zellen im Cytoplasma lokalisiert. r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für das Ad12E1A_{13S}-Flag-Fusionsprotein transfiziert und die Expression des r-SREC-Proteins durch Zugabe von 1 µg Tetrazyklin/ ml Medium für 24 h induziert. Die Zellen fixiert, permeabilisiert und die intrazelluläre Verteilung des r-SREC-Myc-Fusionsproteins bzw. der r-SREC-Myc-Fusionsproteinmutante (A, rot), des Ad12E1A_{13S}-Flag-Fusionsproteins (C, grün) mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen bestimmt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (B, blau) angefärbt. (D) Überlagerung der einzelnen Bilder.

4.4.3 Einfluss von Thapsigargin induzierten ER-Stress auf die Lokalisation des r-SREC-Proteins

Computeranalysen mit r-SREC-Sequenzen ergaben, dass das r-SREC-Protein mit einer Wahrscheinlichkeit von 43 % im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Auch Immunfluoreszenzuntersuchungen gaben erste Hinweise auf eine mögliche Lokalisation des r-SREC-Proteins im endoplasmatischen Retikulum.

Neben der UPR („unfoldet protein response“) und der EOR („ER-overload response“) stellt auch die Infektion der Zelle durch Viren wie, z.B. das Adenovirus, einen Faktor dar, durch den Stress im endoplasmatischen Retikulum ausgelöst werden kann. Die Induktion des ER Stresses geht dann häufig mit der Lokalisationsänderung am Stresssignalweg beteiligter Proteine vom ER in den Zellkern einher; dies ist beispielweise der Fall bei dem ER-assoziierten Protein Aph2, das wie das r-SREC-Protein eine DHHC-Domäne trägt.

Das ER-Stress auslösende Agens Thapsigargin, das einen effektiven Inhibitor von Calcium-Ionen-Pumpen Proteinen (SERCA) intrazellulärer Membranen darstellt, wurde in dem folgenden Experiment verwendet, um zu untersuchen, ob induzierter ER-Stress möglicherweise zu einer Änderung der Lokalisation des r-SREC-Proteins in der Zelle führt. Die r-SREC exprimierenden T-REx-HeLa-Zellen, bei denen die Expression des r-SREC-Protein durch Thapsigargin für 24 h induziert worden war, wurden für 0,5 h, 1 h und 2 h mit 900 mM Thapsigargin/ ml Medium bzw. 1200 mM Thapsigargin/ ml Medium behandelt und danach Immunfluoreszenzuntersuchungen durchgeführt. Die Immunfluoreszenzen wurden unter Verwendung eines anti-Myc Antikörpers mit sekundärem Alexa488-markiertem Sekundärantikörper (Grün), sowie zur Anfärbung des endoplasmatischen Retikulums einem ConcanavalinA-Rhodaminkonjugat (Rot) durchgeführt. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mittels Hoechst33342-Färbung.

Beim Vergleich der Immunfluoreszenzen bei verschiedenen Induktionszeiten und Thapsigargin-Konzentrationen lässt sich keine Lokalisationsänderung des r-SREC-Proteins (Grün) nachweisen (s. Abb. 22). Das r-SREC-Protein ist in allen Fällen im Cytoplasma mit einer Anreicherung in der Nähe des Zellkerns detektierbar. Bei der Überlagerung der einzelnen Bilder ist deutlich erkennbar, dass die Lokalisation mit dem rot markierten endoplasmatischen Retikulum übereinstimmt.

Wie in weiteren Immunfluoreszenzuntersuchungen ermittelt, führt die Verwendung der ER-Stress auslösenden Agenzien DTT und Tunicamycin ebenfalls zu keiner Änderung der intrazellulären Lokalisation des r-SREC-Proteins (Daten nicht gezeigt).

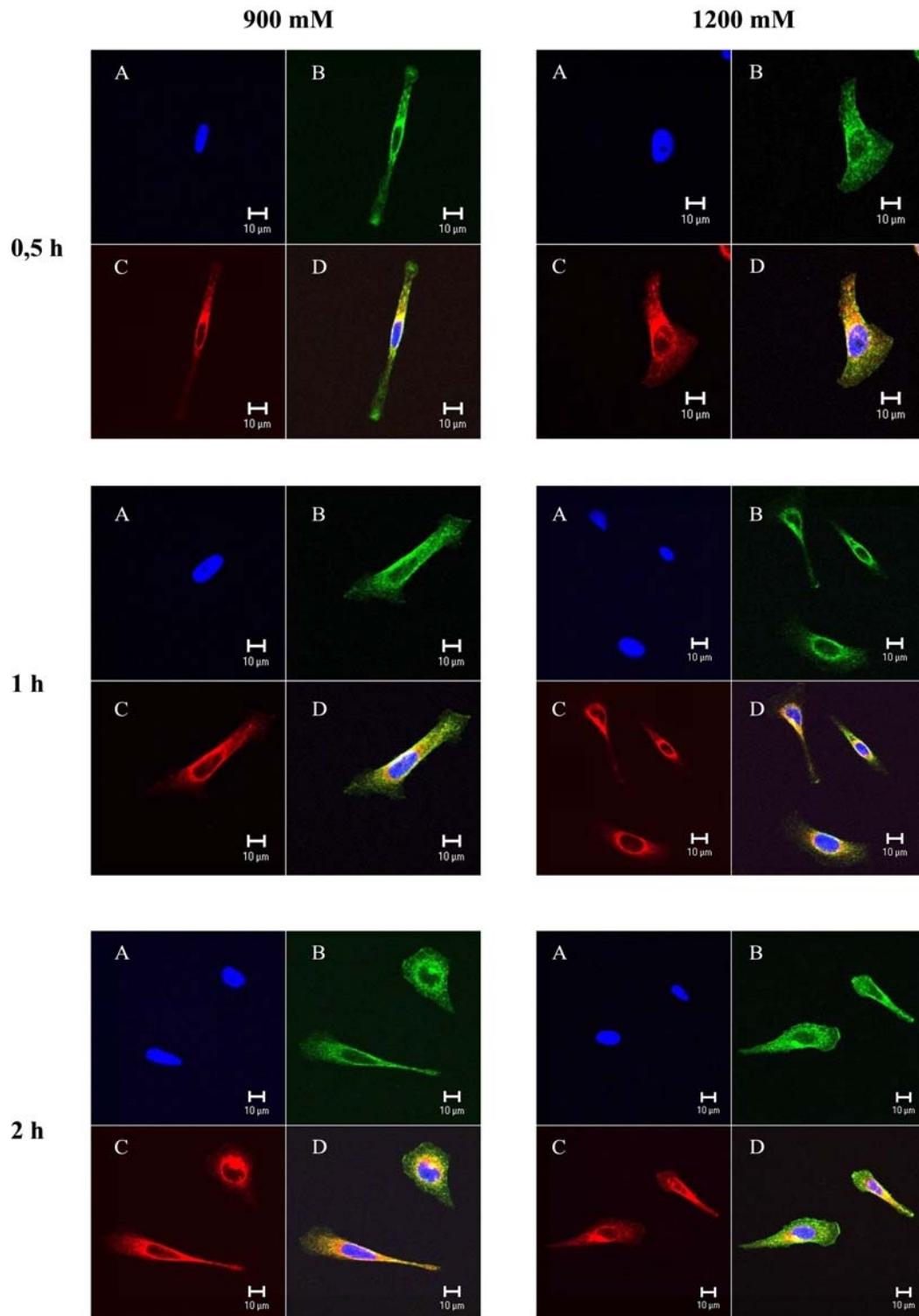


Abb. 22: Die Induktion von ER-Stress durch Thapsigargin führt nicht zu einer Lokalisationsänderung des r-SREC-Proteins. Die Expression des Myc-gekoppeltem r-SREC-Proteins in r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen wurden durch Zugabe von 1 μg Tetrazyklin/ ml Medium induziert. Durch die Zugabe von 900 mM bzw. 1200 mM Thapsigargin/ml Medium für die Dauer von 0,5 h, 1 h, 2 h wurde Stress des endoplasmatischem Retikulum induziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit monoklonalem anti-Myc Antikörper in Verbindung mit FITC-markiertem Sekundärantikörper sowie ConA-Rhodamin-Konjugat inkubiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (Blau) angefärbt.

4.5 Untersuchungen zur putativen Funktion von r-SREC

E1A-Proteine sind in der Lage, mit einer Vielzahl zellulärer Proteine zu interagieren und haben somit die Möglichkeit in die Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse, wie der Zellzykluskontrolle, der Differenzierung und der Apoptose einzugreifen. Das r-SREC-Protein stellt einen neu identifizierten Interaktionspartner des E1A-Proteins dar, über dessen zelluläre Funktion bisher noch keine Daten vorliegen. Erste funktionelle Untersuchungen des zu r-SREC homologen Protein des Menschen, als REAM („reduced expression associated with metastasis“) bezeichnet, lassen vermuten, dass es sich bei dem REAM-Protein um ein Tumorsuppressorgen handeln könnte (Oyama *et al.*, 2001).

Die Tatsache, dass r-SREC cytoplasmatisch lokalisiert ist und auch in Gegenwart von E1A-Proteinen im Cytoplasma verbleibt, lässt vermuten, dass es keinen transkriptionellen Co-Faktor der E1A-Proteine darstellt, sondern spezifische Funktionen im Cytoplasma ausübt. Das r-SREC-Protein könnte am Transport von Proteinen im Cytoplasma beteiligt sein, (b) wichtige Funktionen in spezifischen Signaltransduktionketten übernehmen oder in die Regulation des Zellzyklus involviert sein.

4.6 Identifikation von zellulären Interaktionspartnern des r-SREC Proteins

Um Hinweise auf mögliche Funktionen des r-SREC-Proteins und den zellulären Signalweg, in den es involviert ist, zu erhalten, wurde zum einen versucht zelluläre Interaktionspartner mit Hilfe des SOS-„Two-Hybrid“-Systems zu detektieren und zum anderen in ihrer Genexpression veränderte Gene mit Affymetrix-Genchips zu detektieren.

4.6.1 Identifikation von zellulären Interaktionspartnern des r-SREC-Proteins mit Hilfe des Hefe SOS-„Two-Hybrid“-Systems

Zur Identifikation zellulärer Faktoren, die mit dem r-SREC-Protein interagieren wurden zunächst Protein/Protein-Interaktionsstudien im Hefe SOS-„Two-Hybrid“-System durchgeführt, dass eine Analyse von Protein/Protein-Interaktionen unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen ermöglicht.

Das SOS-,Two-Hybrid“-System beruht auf der Tatsache, dass bei der Verwendung eines SOS-defizienten Hefestammes (*cdc-25-2*) nur bei einer Translokation des als SOS-Fusionsprotein exprimierten Köderproteins (pADNS-SOS) aufgrund der Bindung an ein über ein Myr-Signal an die Zellmembran verankertes Protein der cDNA Expressionsbank, der Ras abhängige Signalweg geschlossen ist und ein Wachstum der Hefezellen bei der selektiven Temperatur von 36°C möglich ist.

Zur Identifikation zellulärer Interaktionspartner des r-SREC-Proteins wurde eine embryonale Ratten-Hypophysen cDNA Bank verwendet, die mit -Hilfe von Random-Primern aus mRNA embryonaler Ratten Hypophysen-Zellen generiert und nach anschließendem *XhoI/EcoRI*-Restriktionsverdau in allen drei Leserahmen in den Hefeexpressionsvektor pYES2-Myr kloniert wurde. Die Expression von der cDNA-Bank kodierten Proteine steht unter der Kontrolle eines induzierbaren Galaktose-Promotors und werden als Fusionsprotein mit einem v-Myristillierungssignal exprimiert. Diese cDNA-Bank bestand ursprünglich aus $2 \cdot 10^6$ Klonen; nach Amplifikation bestand die hier verwendete cDNA-Bank aus $7,2 \cdot 10^6$ Klonen. Als Köderprotein diente r-SREC-Protein, das aufgrund der Einklonierung des r-SREC Gens in das Plasmid pADNS-SOS, in den Hefezellen als Fusionsprotein mit einem C-terminalen SOS-Protein exprimiert wird. Die Expression von cDNAs, die für Proteine der Ras-GTPase Familie kodieren, sind jedoch auch ohne spezifische Protein/Protein-Interaktion mit dem Köderprotein in der Lage, bei der selektiven Temperatur zu wachsen und werden somit als falsch positive Klone isoliert. Die Anzahl der detektierten falsch positiven Klone kann jedoch durch die zusätzlich Expression von mGAP (mammalian GTPase activating Protein), das im Gegensatz zum GAP-Protein der Hefe in der Lage ist die Aktivität vom mRas zu inhibieren, reduziert werden.

Um das SOS-,Two-Hybrid“-System auf seine Funktionalität zu prüfen, habe ich als erstes in einem Kontrollexperiment gezeigt, dass E1A-Sequenzen an r-SREC binden. Die in der Abb. 23 dargestellten Ergebnisse zeigen eindeutig, dass nur für den Fall, dass das Köderprotein entsprechende E1A-Proteinsequenzen enthält, der Ras-Signalweg geschlossen ist und die Hefezellen Galaktose-abhängiges Wachstum bei der restriktiven Temperatur von 36 °C zeigen. Die Kontrollen zeigen kein Wachstum der Hefezellen.

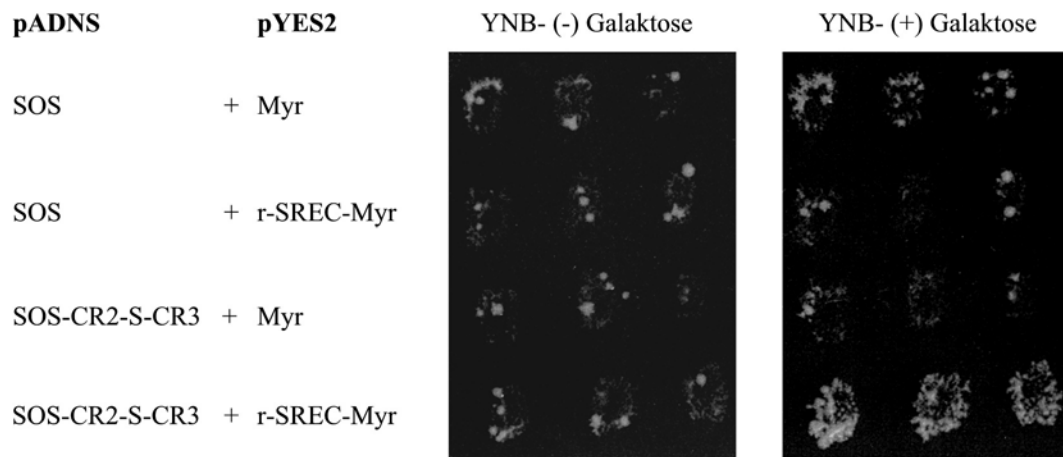


Abb. 23: Überprüfung des verwendeten Hefestammes.

Die Hefen des Stammes *cdc-25-2* wurden zur Kontrolle mit dem Plasmid pADNS-SOS, in das spezifische E1A-Sequenzen (CR2-S-CR3) einkloniert waren und dem pYES2-Myr Plasmid, in das das r-SREC-Gen kloniert war, bzw. den entsprechenden Leervektoren transformiert. Anschließend wurden die Klone bei 25 °C kultiviert, ausgestrichen, nach erneuten Wachstum bei 25°C zur Kontrolle auf Galaktose-Selektionsmedium (YNB-(+)-Galaktose; YNB-(-)-Galaktose) überstempelt und bei der selektiven Temperatur von 36 °C für 3 Tage inkubiert.

Zur Identifikation von zellulären Interaktionspartnern des r-SREC-Proteins wurde der temperatursensitive Hefestamm (*cdc25-2*) zunächst mit dem Köderplasmid (pADNS-SOS-r-SREC) und dem Plasmid pYES2-mGAP nach der Methode von Klebe *et al.* co-transformiert.

Nach Selektion dienten dieser Hefezellen als Ausgangsstamm für die Transformation mit der cDNA-Bank. Es wurden insgesamt Expressionsprodukte von $5,42 \cdot 10^7$ Plasmiden der cDNA-Bank auf die Interaktion mit dem r-SREC-Protein hin überprüft. Die zusätzlich mit der cDNA transformierten Klone wurden zunächst bei der nicht selektiven Temperatur von 25 °C unter Selektion kultiviert. Anschließend wurden sie auf Galaktose-Selektionsplatten (YNB-(+)-Galaktose, YNB-(-)-Galaktose) überstempelt und bei der selektiven Temperatur von 36 °C inkubiert. Zur weiteren Selektion von Hefeklonen, deren Produkt der cDNA mit dem r-SREC-Protein interagiert wurden diese Hefeklone in zwei aufeinander folgenden Replika-Plattierungen erneut auf ein Galaktose-abhängiges Wachstum bei der selektiven Temperatur von 36 °C hin überprüft. Nach der Transformation wurden zunächst 4018 Klone überprüft, von denen nach der zweiten Replika-Plattierung noch 298 Klone die Wachstumsbedingungen erfüllten. Nach erneuter Replika-Plattierung zeigten noch 29 Klone ein Galaktose-abhängiges Wachstum bei der selektiven Temperatur von 36 °C (s. Tab.1).

Tab. 1: Anzahl der transformierten Klone nach den Replika-Plattierungszyklen

Die Hefezellen des Stammes *cdc-25-2*, die zuvor mit dem pADNS-SOS-r-SREC Plasmid und dem pYES2-mGAP Plasmid transformiert worden waren, wurden mit der cDNA Bank transformiert und auf Galaktose-abhängiges Wachstum bei der selektiven Temperatur von 36 °C unter Selektion der verschiedenen Selektionsmarker (- LEU, - URA, - TRP) überprüft.

Replika-Plattierung	Anzahl der selektierten Klone
1	4018
2	298
3	29

Diese Klone stellten potentiell positive Klone für eine Interaktion mit dem Köderprotein r-SREC dar, und sollten nun darauf hin überprüft werden, ob das selektive Wachstum auf eine Interaktion des durch die cDNA-Bank kodierten Proteins und des r-SREC-Proteins zurückzuführen ist.

Zur weiteren Überprüfung wurde von diesen Hefeklonen die DNA präpariert und zur Vereinzelung der drei enthaltenen Plasmide (pADNS-R-SREC-SOS, pYES2-mGAP, pYES2-cDNA-Myr) in elektrokompetente *E. coli* Bakterien transformiert. Die Überprüfung der enthaltenen Plasmide erfolgte in einer sog. Multiplex-PCR mit Primern die spezifisch für Sequenzen der jeweiligen Selektionsmarkern sind. Von den Bakterienklonen, die das cDNA-Bank Plasmid enthielten, wurde die Plasmid-DNA isoliert. cDNA-Bank Plasmide, die für Proteine der Ras-Familie kodieren, sind in der Lage, unabhängig von der Interaktion mit dem SOS-gekoppelten Köderprotein, den Ras-Signalweg kurzzuschließen und bei der selektiven Temperatur von 36 °C zu wachsen. Trotz der Verwendung des pYES2-mGAP Plasmids, dessen Produkt ein Kurzschließen des Ras-Signalwegs durch mRas weitgehend verhindern soll, kann nicht ausgeschlossen werden, dass falsch positive Klone identifiziert wurden. Die isolierten cDNA-Bank Plasmide wurden daher in Hefezellen des *cdc-25-2* Stammes mit dem pADNA-r-SREC-SOS Plasmid oder dem pADNS-SOS Leervektor co-transformiert und daraufhin überprüft, ob das Galaktose-abhängige Wachstum bei 36 °C abhängig vom Köderprotein r-SREC war. Klone, die ein vom Köderprotein unabhängiges Wachstum zeigen, wurden potentiell als Klone eingestuft, die ein cDNA Bank Plasmid mit Ras spezifischen Sequenzen enthalten und daraufhin durch PCR mit Ras-Gen spezifischen Primern überprüft (Daten nicht gezeigt).

Tab. 2: Co-Transformation der cDNA-Bankplasmide der in der Replika-Plattierung isolierten Klone.

Nach der Isolierung der DNA der einzelnen Klone wurden die enthaltenen Plasmide vereinzelt und das enthaltene der c-DNA Bank Plasmid mit dem Köder r-SREC-pADNS-SOS bzw. dem pADNS-SOS Leervektor in den Hefestamm *cdc-25-2* co-transformiert und auf Galaktose-abhängiges Wachstum bei 36 °C in Abhängigkeit vom Köderprotein hin überprüft.

Anzahl der co-tranformierten Klone	Wachstum bei selektiver Temperatur von 36 °C
insgesamt 29 Klone	
6	kein Wachstum
23	Wachstum unabhängig von Köderprotein r-SREC
0	Wachstum abhängig von Köderprotein r-SREC

In diesen erneuten Überprüfung der Interaktion zeigten 6 von 29 überprüften Klone nach der Co-Transformation kein Wachstum bei der selektiven Temperatur von 36 °C (s. Tab. 2). Galaktose-abhängiges Wachstum bei 36 °C, unabhängig vom Köderprotein r-SREC, wurde in 23 Fällen nachgewiesen. In allen 23 Fällen konnte durch PCR mit Ras-Gen spezifischen Primern und in einigen Fällen durch Sequenzierung das Vorliegen von spezifischen Sequenzen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Von den überprüften cDNA-Bank Plasmiden zeigte, nach erneuter Co-Transformation mit dem Köderprotein, kein transformierter Klon Galaktose-abhängiges Wachstum bei 36 °C in Abhängigkeit vom Köderprotein r-SREC.

Ein Interaktionspartner des r-SREC-Proteins konnte unter Verwendung dieses SOS-„Two-Hybrid“-Systems und der embryonalen Ratten-Hypophysenbank folglich nicht identifiziert werden.

4.6.2 Identifikation von zellulären Interaktionspartnern des r-SREC-Proteins mit Hilfe von Genchip-Analysen

Ein anderer Weg, Hinweise auf mögliche Interaktionspartner von noch weitgehend unbekanntem Genprodukten zu erhalten, sind Genchip-Analysen, die Auskünfte darüber geben können, in welchem Signaltransduktionsweg das zu untersuchende Protein möglicherweise involviert ist. Mit Hilfe der Genchips kann die Änderung der Genexpression in Zellen in Bezug auf Kontrollzellen überprüft werden.

Für die Genchip-Analysen wurde der DNA-Chip U133A der Firma Affymetrix verwendet, da dieser besonders viele Sequenzen von Proteinen enthält, die spezifische Funktionen in der Zellzyklusregulation oder der Onkogenese ausüben. Die Genchip-Analyse

wurde wie unter Punkt 3.3.7 beschrieben durchgeführt und mit den aufgeführten Algorithmen ausgewertet. Die Menge der analysierte Gene macht es notwendig, Kriterien für die Auswahl der Kandidatengene zu treffen. Daher wurden nur Kandidaten analysiert, die als „present“ (P) detektiert wurden, also ein signifikantes auswertbares Signal auf dem Chip zeigten. Die Induktion bzw. Reduktion der Genexpression musste mindestens um den Faktor 2 erfolgen.

4.6.2.1 Detektion von Genexpressionänderungen unter Verwendung von mRNA aus stabil r-SREC transformierten KB-Zellen mittels Chip Analysen

Für die Untersuchung der Genexpression in r-SREC exprimierenden Zelllinien wurden zunächst stabil r-SREC (pcDNA3.1) transformierte KB-Zellen verwendet, in denen das r-SREC-Protein in das Zellgenom kovalent integriert vorliegt und konstitutiv exprimiert wird. Als Kontrolle diente eine ebenso generierte Zelllinie, die jedoch den Leervektor enthielt. Bevor die Zelllinien für den Chip eingesetzt wurden, wurde zunächst die Expression des Myc-getaggten r-SREC-Protein mittels Western-Blot Analyse bestätigt. Gleichzeitig wurde aus diesen Zelllinien mRNA isoliert und RT-PCR-Analysen mit r-SREC spezifischen Primern durchgeführt, um die Qualität der isolierten mRNA zu überprüfen. Zum gleichen Zeitpunkt wurde die Menge der r-SREC exprimierenden Zellen mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Untersuchungen bestimmt.

Die Überprüfung der Expression des r-SREC-Proteins in den stabil transformierten KB-Zellen zeigt die Abb. 24A. Von den KB-Zellen wurden Gesamtzellextrakte präpariert und anschließend 70 µg Gesamtprotein auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel geblottet und der Blot mit einem anti-Myc Antikörper und anschließend mit einem an alkalische Phosphatase konjugierten anti-Maus Antikörper inkubiert. Nach Behandlung mit Detektionsreagenz wurde eine Autoradiographie durchgeführt. Das Ergebnis zeigt die Abb. 24A. In der Spur 1 ist ein Gesamtzellextrakt aus mit r-SREC transfizierten Cos7-Zellen als Positivkontrolle aufgetragen. In der Spur 2, in der der Gesamtzellextrakt der stabil r-SREC exprimierenden KB-Zelllinie aufgegeben wurde, ist deutlich eine Bande in gleicher Höhe der Positivkontrolle (Spur 1) detektierbar. Die untere der beiden Banden zeigt ein unspezifisches Signal. Bei den KB-Zellen die stabil mit dem Leervektor transfiziert wurden (Spur 3), ist hingegen nur die untere unspezifische Bande zu erkennen. Die Expression der r-SREC-Proteins konnte somit durch Western-Blot Analysen bestätigt werden. Um den Anteil der r-SREC exprimierenden Zellen zu bestimmen, wurden Immunfluoreszenz-Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurden die beiden KB-Zelllinien auf

Deckgläschen ausgesät und nach 24 h fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden sie mit anti-Myc Antikörper, zum Nachweis des Myc-gekoppelten r-SREC-Proteins, und sekundärem Cy3-markiertem anti-Maus Antikörper (Rot), sowie zur Anfärbung des Zellkerns mit Hoechst33342 (Blau) inkubiert.

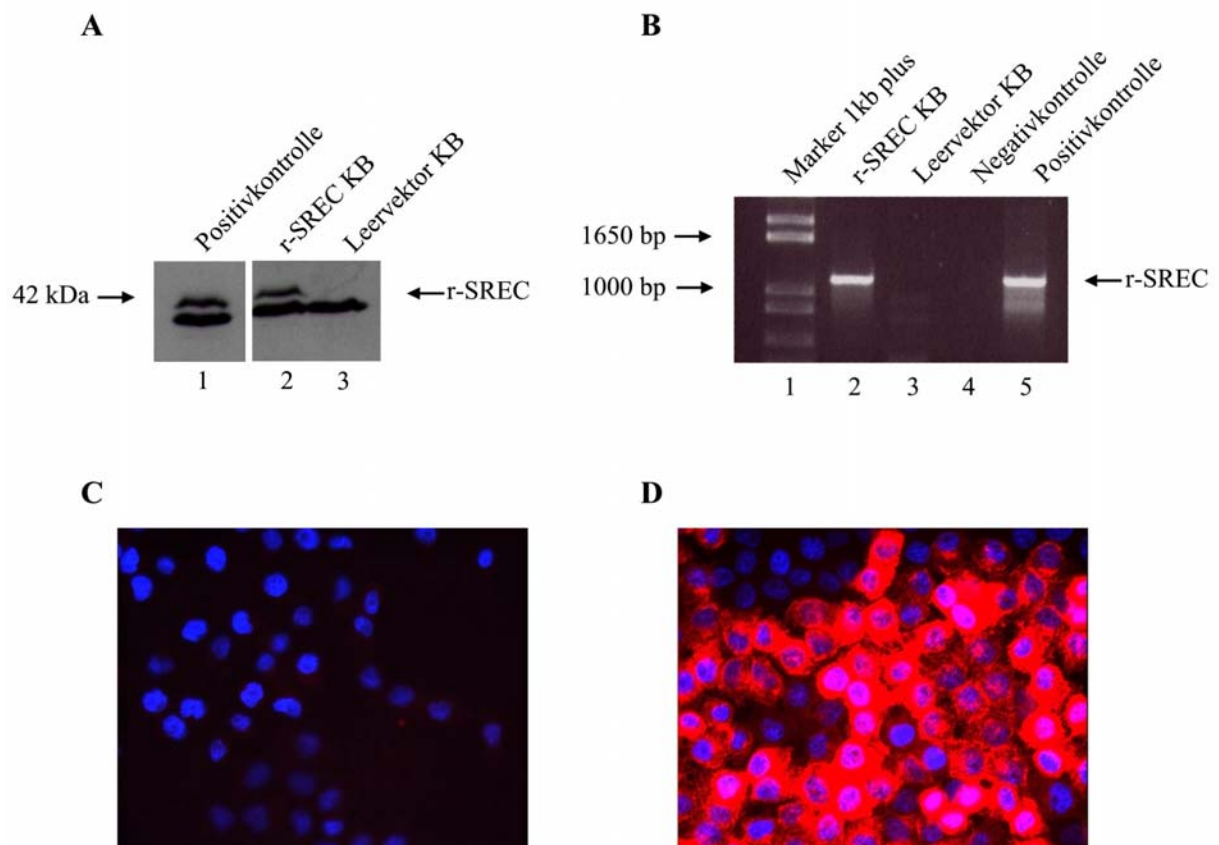


Abb. 24: Die stabil r-SREC transfizierte KB-Zelllinie exprimiert r-SREC.

A: Von den stabil transfizierten KB-Zellen wurden Proteinextrakte hergestellt und 70 μ g Gesamtprotein auf ein 12 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und nach dem Gellauf geblottet. Nach Detektion mit anti-Myc Antikörper und entsprechendem HPO-konjugierten Sekundärantikörper konnte das Myc-gekoppelte r-SREC-Protein in der Positivkontrolle (transient transfizierte Zellen, Spur 1), und in den stabil r-SREC exprimierenden KB-Zellen (Spur 2) nachgewiesen werden. Bei den mit dem Leervektor stabil transfizierten KB-Zellen konnte keine Bande in identischer Höhe nachgewiesen werden (Spur 3).

B: Aus den Zelllinien wurde mRNA isoliert und eine RT-PCR mit r-SREC spezifischen Primern durchgeführt. Als Positivkontrolle diente in der PCR das Plasmid r-SREC pcDNA3.1, als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne DNA-Matrize. Bei den stabil mit dem r-SREC transfizierten KB-Zellen (Spur 2) ist eine Bande in Höhe der Positivkontrolle detektierbar (Spur 5). Bei den mit dem Leervektor transfizierten Zellen (Spur 3) ist, ebenso wie bei der Negativkontrolle, keine Bande in Größe der Positivkontrolle nachweisbar.

C /D: Um die Anzahl der stabil transfizierten KB-Zellen mittels Immunfluoreszenzuntersuchungen zu bestimmen, wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und nach Fixierung und Permeabilisierung mit einem anti-Myc Antikörper gegen das Myc-gekoppelte r-SREC-Protein und sekundären Cy3-markiertem Antikörper (Rot) inkubiert. Der Zellkern wurde mittels Hoechst33342 (Blau) angefärbt. Bei den mit dem Leervektor transfizierten Zellen wurde kein r-SREC-Protein nachgewiesen (C). Bei den mit r-SREC stabil transfizierten KB-Zellen zeigt die Mehrzahl der Zellen eine rote Fluoreszenz und exprimiert somit das r-SREC-Protein (D).

Wie in Abb. 24D dargestellt, zeigen die Mehrzahl (ca. 80%) der r-SREC transformierten KB-Zellen eine rote Fluoreszenz und exprimieren somit das r-SREC-Protein.

In den nur mit dem Leervektor transformierten KB-Zelllinie ist nur der mit Hoechst33342 angefärbte Zellkern zu detektieren (s. Abb. 24C).

Von den so überprüften Zelllinien wurde jeweils mRNA für die Genchip-Analysen isoliert. Sie wurde mittels RT-PCR unter Verwendung für das r-SREC-Gen spezifischer Primern auf ihre Qualität überprüft (s. Abb. 24B). In der Spur 2, in der eine mRNA-Probe der stabil r-SREC transformierten KB-Zelllinie aufgetragen wurde, ist deutlich eine Bande mit einer Größe von ca. 1098 bp sichtbar, die in ihrer Höhe mit der Positivkontrolle übereinstimmt (Spur 5). Die entsprechenden Negativkontrollen zeigen kein Signal in der erwarteten Größe (Spur 3, Spur 4). Die so überprüfte mRNA wurde anschließend für die Genchip-Analysen eingesetzt.

Die Rohdaten des Genchips wurden unter Verwendung der im Punkt 3.2.6.2 beschriebenen Algorithmen und unter Berücksichtigung einer Expressionsänderung mindestens um den Faktor 2 selektiert. Bei den Genchip unter Einsatz von mRNA der r-SREC exprimierenden KB-Zellen im Vergleich zur nicht r-SREC exprimierenden Zelllinie konnte eine Änderung der Genexpression von 19 Genen nachgewiesen werden (s. Tab. 3).

Die im Genchip detektierten Gene können entsprechend ihrer Funktion in der Zelle in Gruppen zusammengefasst werden.

Allgemeine Synthesefunktionen oder die Aminosäuresynthese können den erhöht exprimierten Genen Prostaglandin-GH-Synthase (2,19 fach), „Homo sapiens PAPS Synthase-2“ (2,6 fach) und der „Alanin-glyoxylate Aminotransferase 2 –like 1“ (4,9 fach) zugeschrieben werden.

Die exprimierten Proteine der erhöht exprimierten Gene Desmoplakin (2,5 fach) und Kollagen Typ XV (2,8 fach), sowie „Microfibrill-associated glycoprotein-2“ (2,4 fach) sind an der Bildung der Zellstruktur beteiligt.

Die Substrate der Protein Kinase C „Homo sapiens myristoylated alanin rich protein kinase c substrate“ und „Homo sapiens ataxia-telangiectasia group D-associated protein“ wiesen eine Erhöhung der Genexpression um 2,27 bzw. 2,7 auf.

Der „Homo sapiens SWI/SNF related matrix associated actin dependent regulator of chromatin subfamily a member1“ (2,01 fach erhöht) und das Protein Enolase 3 (2,01 fach erhöht) sind an der Regulation der Genexpression beteiligt.

Das Gen „Homo sapiens wingless-Type MMTV integration site family, member 5a“ wird um den Faktor 2,25 erhöht exprimiert. Das Produkt dieses Gens ist in eine Vielzahl von Signalwegen involviert, beispielsweise wirkt es als Wachstumsfaktor und wird mit der

Invasivität von Tumoren, der Steuerung des Calciumspiegels, der Zell-Zell-Kommunikation und dem Protein Kinase C-Signalweg in Verbindung gebracht. Das Genprodukt von Sorcin spielt ebenfalls eine Rolle bei der Regulation des Calciumspiegels (2-fach erhöhte Expression). Das Produkt des um den Faktor 2,06 erhöht exprimierten Gen Synuclein- α wirkt bei Überexpression inhibierend auf die Protein Kinase C.

Der „Homo sapiens nuclear factor of activated T-Cells 5“ ist ein Calcium-regulierter Transkriptionsfaktor, der in den Calcium/Calcineurin-Signalweg und den Protein Kinase C-Signalweg eingreift (2,28-fach erhöhte Expression).

Die Ergebnisse dieser Analyse können dahingehend zusammengefasst werden, dass sich die Änderung der Genexpression nur in Richtung einer erhöhten Expression einiger Gene bewegte. Eine reduzierte Genexpression bestimmter Gene wurde nicht detektiert. Obwohl einige der Gene mit der Protein Kinase C, sowie der Regulation des Calciumspiegels in Verbindung gebracht werden können, geben sie keine Hinweise auf spezifische Signaltransduktionswege, die Rückschlüsse auf mögliche Funktionen von r-SREC zulassen könnten.

Tab. 3: Im Affymetrix-Genchip detektierte Genexpressionsänderungen bei Verwendung vom mRNA aus stabil r-SREC exprimierenden KB-Zellen. Spalte 1: Nummer, die dem Gen durch die Firma Affymetrix zugewiesen wurde; Spalte 2: Bezeichnung des Gens; Spalte 3: Art der Änderung der Genexpression D („Decrease“, Erniedrigung) I („Increase“, Erhöhung); Spalte 4: Höhe der Genexpressionsänderung („fold change“).

Affymetrix-Nr.	Name des Gens	Art der Genexpressionsänderung	Höhe der Genexpressionsänderung („fold change“)
15813_s	Prostaglandin-GH-Synthase	I	log ratio 1,13 (2,19 fach)
200606	<i>Homo sapiens</i> desmoplakin	I	log ratio 1,35 (2,5 fach)
201669	<i>Homo sapiens</i> myristoylated alanin rich protein kinase C substrate	I	log ratio 1,18 (2,27 fach)
202504	<i>Homo sapiens</i> ataxia-telangiectasia group D-associated Protein	I	log ratio 1,44 (2,7 fach)
20303477	<i>Homo sapiens</i> Kollagen Typ XV	I	log ratio 1,49 (2,8 fach)
203060	<i>Homo sapiens</i> PAPS synthase-2	I	log ratio 1,41 (2,6 fach)
203875	<i>Homo sapiens</i> SWI/SNF related matrix associated actin dependent regulator of chromatin, subfamily a member 1	I	log ratio 1,01 (2,01 fach)
204483	<i>Homo sapiens</i> enolase 3 (beta, muscle)	I	log ratio 1,01 (2,01 fach)
205990	<i>Homo sapiens</i> wingless-type MMTV integration site family, member 5A	I	log ratio 1,17 (2,25 fach)
207761_s	<i>Homo sapiens</i> DKFZP586A0522 protein	I	log ratio 1,79 (3,45 fach)
208003_s	<i>Homo sapiens</i> nuclear factor of activated T-Cells 5	I	log ratio 1,19 (2,28 fach)
208920	Sorcin	I	log ratio 1 (2fach)
209758	Human microfibril-associated glycoprotein-2	I	log ratio 1,28 (2,4 fach)
211546	Synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)	I	log ratio 1,04 (2,06 fach)
212094	Consensus includes GB: AL582836	I	log ratio 1,12 (2,17 fach)
213764_s	Consensus includes GB:AW665892	I	log ratio 1,28 (2,43 fach)
218687	<i>Homo sapiens</i> hypothetical protein FLJ20063	I	log ratio 1,98 (3,9fach)
221008_s	<i>Homo sapiens</i> Alanin-glyoxylate Aminotransferase 2-like 1	I	log ratio 2,29 (4,9 fach)
39148	<i>Homo sapiens</i> code, 3 end /clone Image-296424 (GB: N74607)	I	log ratio 1,55 (2,9 fach)

4.6.2.2 Detektion von Genexpressionänderungen unter Verwendung von mRNA aus induzierbar r-SREC exprimierenden T-REx-HeLa-Zellen mittels Chip-Analysen.

Gegenüber der stabil r-SREC exprimierenden KB-Zelllinien hat die in dieser Arbeit etablierte T-REx-HeLa-Zelllinie den großen Vorteil, dass für die Präparation der mRNA aus r-SREC exprimierenden Zellen die gleiche Zelllinie verwendet werden kann, die auch zur Präparation der Kontroll-mRNA dient, indem die Expression von r-SREC entweder induziert oder nicht induziert wurde. Gleichzeitig wurde durch Immunfluoreszenz-Untersuchungen gezeigt, dass nach Induktion mit Tetrazyklin nahezu alle T-REx-HeLa-Zellen das r-SREC-Protein in ausreichender Menge exprimierten (s. Abb. 18). Von der etablierten r-SREC-T-REx-HeLa-Zelllinie wurde Zellen ausgesät und bei einem Teil der Zellen durch Zugabe von 1 µg Tetrazyklin/ ml Medium die Expression des r-SREC-Proteins für die Dauer von 24h induziert. Anschließend wurde aus den Zellen jeweils mRNA isoliert, mit RT-PCR unter Verwendung r-SREC spezifischer Primer auf ihre Qualität hin überprüft (s. Abb. 25) und für den Affymetrix-Genchip eingesetzt.

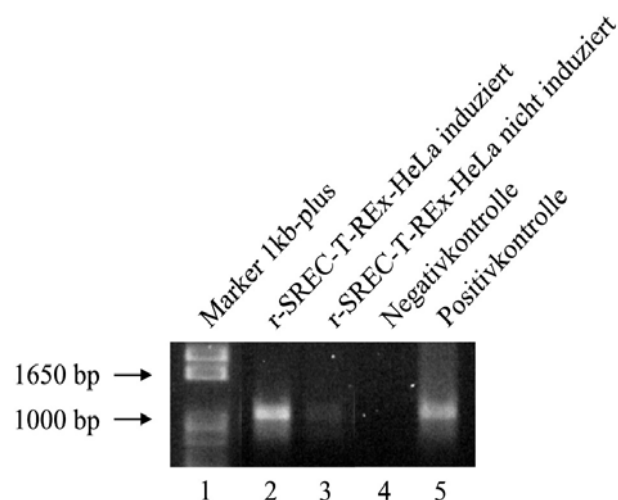


Abb. 25: Die r-SREC mRNA ist in induzierten r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen mittels RT-PCR detektierbar. Durch Zugabe von 1 µg Tetrazyklin/ ml Medium wurde die Expression des r-SREC-Proteins bei einem Teil der Zellen induziert. Aus den Zellen wurde die mRNA isoliert und eine RT-PCR mit für das r-SREC-Gen spezifischen Primern durchgeführt. Als Positivkontrolle in der PCR diente in das Plasmid pcDNA3.1 einkloniertes r-SREC-Gen; bei der Negativkontrolle wurde keine DNA-Matrize zugegeben. Bei Verwendung der mit Tetrazyclin induzierten r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen (Spur 2) ist deutlich eine Bande in Höhe der Positivkontrolle detektierbar (Spur 5). Bei den nicht induzierten r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen (Spur 3) ist, ebenso wie bei der Negativkontrolle (Spur 4) keine Bande in Höhe der Positivkontrolle nachweisbar.

Die erhaltenen Daten dieses Genchips wurden ebenfalls unter Verwendung der im Punkt 3.2.6.2 beschriebenen Algorithmen und unter Berücksichtigung einer Expressionsänderung

von mindestens um den Faktor 2 selektiert Die beim Affymetrix-Genchip detektierte Änderung der Genexpression von 9 Genen in r-SREC exprimierenden T-REx-Zellen zeigt die Tab. 4.

Die am Proteintransport beteiligten Produkte der Gene „Signal recognition particle receptor (docking Protein)“ und „Coatomer protein komplex, subunit alpha“ wurden um den Faktor 3,09 fach erniedrigt bzw. 3,16 fach erniedrigt exprimiert.

Der „Interleukin 6 signal transducer“ fungiert als ein Teil des Cytokine-Rezeptor-Komplexes und wird um den Faktor 2,87 geringer exprimiert.

Das Gen des „Lambdaiota protein kinase C interacting protein“ wird um den Faktor 3,11 fach erniedrigt exprimiert und stellt eine atypische Form der Protein Kinase C dar, die nicht durch Calcium reguliert wird.

Zur Gruppe der Transkriptionsfaktoren gehören die Gene „Nuclear receptor ERR γ 2“ (3,18 fach erniedrigt), das „DEADH box polypeptide“ (2,93 fach erniedrigt) und das ribosomale Protein S13 (8,51 fach erniedrigt). Das ribosomal Protein S13 ist das am stärksten regulierte Gen.

Tab. 4: Im Affymetrix Genchip detektierte Genexpressionsänderungen bei Verwendung vom mRNA aus induzierbar r-SREC exprimierenden T-REx-HeLa-Zellen.

Spalte 1: Nummer , die dem Gen durch die Firma Affymetrix zugewiesen wurde; Spalte 2 : Bezeichnung des Gens; Spalte 3: Art der Änderung der Genexpression D („Decrease“, Erniedrigung) I („Increase“, Erhöhung); Spalte 4: Höhe der Genexpressionsänderung („fold change“).

Affymetrix-Nr.	Gen	Art der Genexpressionsänderung	Höhe der Genexpressionsänderung („fold change“)
200917	Consensus includes GB: BG474541; Hs.75730 signal recognition particle receptor (docking Protein)	D	log ratio -1,63 (3,09 fach)
204864	<i>Homo sapiens</i> interleukin 6 signal transducer	D	log ratio -1,52 (2,87 fach)
209966	<i>Homo sapiens</i> nuclear receptor ERG2 (estrogen-related receptor gamma)	D	log ratio -1,67 (3,18 fach)
210057	<i>Homo sapiens</i> lambdaiota protein kinase C interacting protein	D	log ratio -1,64 (3,11 fach)
211708	<i>Homo sapiens</i> Klon MGC:10264 GB: BC005807.1	D	log ratio -1,45 (2,73 fach)
212105	Consensus includes GB: BF313832 DEADH (Asp-Glu-Ala-AspHis) box polypeptide 9 (RNA helicase A, nuclear DNA helicase II; leukophysin)	D	log ratio -1,55 (2,93 fach)
212113	Consensus includes GB: AI927479 Hs.165590 ribosomal protein S13	D	log ratio -3,09 (8,51 fach)
214336	Consensus includes GB: AI621079 Hs.75887 coatomer protein complex, subunit alpha	D	log ratio -1,66 (3,16 fach)
217601	Consensus includes GB:AL523184 Hs.288146 ESTs, Highly similar to KIAA0169 protein <i>Homo sapiens</i>	D	log ratio -2,33 (5,03 fach)

4.6.3 Einfluss der Expression des r-SREC-Proteins auf die Apoptose in T-REx-HeLa-Zellen

Aph2, welches wie r-SREC eine DHHC-Domäne trägt und mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziiert ist, ist an der Regulation der Stressantwort des endoplasmatischen Retikulums beteiligt, die in der Regel zur Apoptose der Zellen führt. Daher sollte geprüft werden, ob möglicherweise auch r-SREC-Funktionen in Apoptose-Signalwege involviert sind.

Die Expression des r-SREC-Proteins in T-REx-HeLa-Zellen wurde durch unterschiedlich lange Gaben von Tetrazyklin induziert (24, 48 und 72 Stunden) und ein TUNEL-Assay durchgeführt. Im TUNEL-Assay wird die in Folge der Apoptose degradierte DNA mittels Fluorescein gekoppeltem dUTP visualisiert und die Anzahl der apoptotischen Zellen bestimmt. Als Kontrolle der Zellzahl dienten gleich behandelte Zellen, deren Zellkerne mittels Hoechst33342 (Blau) angefärbt wurden. Nicht induzierte r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen wurden als Negativkontrolle eingesetzt (s. Abb. 26). Als Positivkontrolle dienten r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen, die nach Fixierung und Permeabilisierung mit DNaseI behandelt wurden, um DNA-Strangbrüche zu induzieren. Während in der Negativkontrolle sind keine grün fluoreszierenden apoptotischen Zellen zu detektieren sind; zeigen die mit DNaseI behandelten Zellen der Positivkontrolle eine starke grüne Fluoreszenz. Die für die Dauer von 24 h durch Tetrazyklin induzierten r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen zeigen ebenfalls eine deutliche grüne Fluoreszenz, die sich mit der Dauer der Expression des r-SREC-Proteins (48 h; 72 h; s. Abb. 27) verstärkt.

Die Expression des Proteins r-SREC führt somit schon nach einer Expressionsdauer von 24 h zu einer Induktion der Apoptose in den T-REx-HeLa-Zellen.

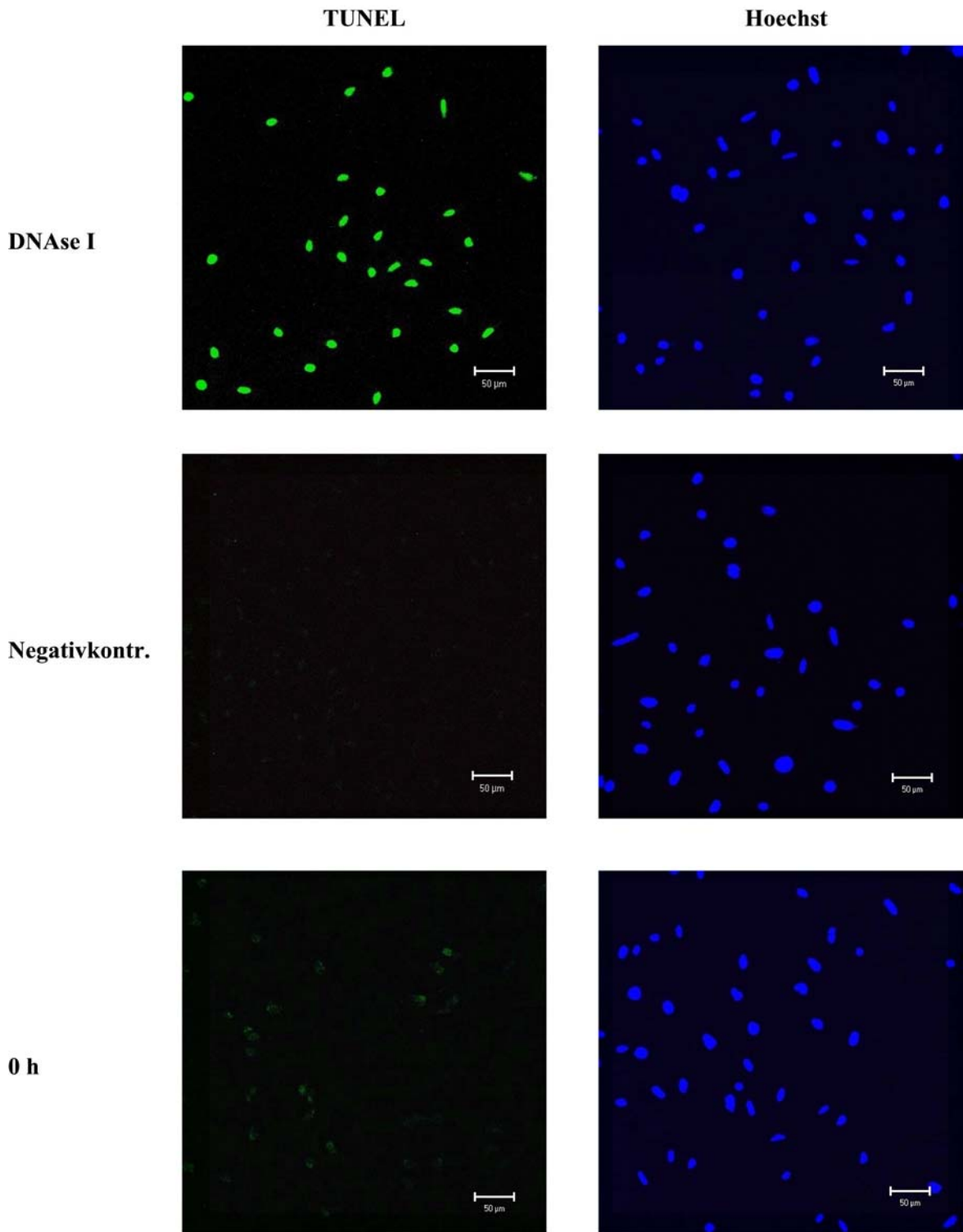


Abb. 26: Kontrollen des TUNEL-Assays von induzierten r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen. Als Positivkontrolle dienten mit DNaseI behandelte Zellen, als Negativkontrolle wurde TUNEL-Reagenz ohne TdT zugegeben, sowie nicht induzierte r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen. Als Kontrolle der Zellzahl wurden die Zellkerne gleich behandelter Zellen mit Hoechst33342 angefärbt.

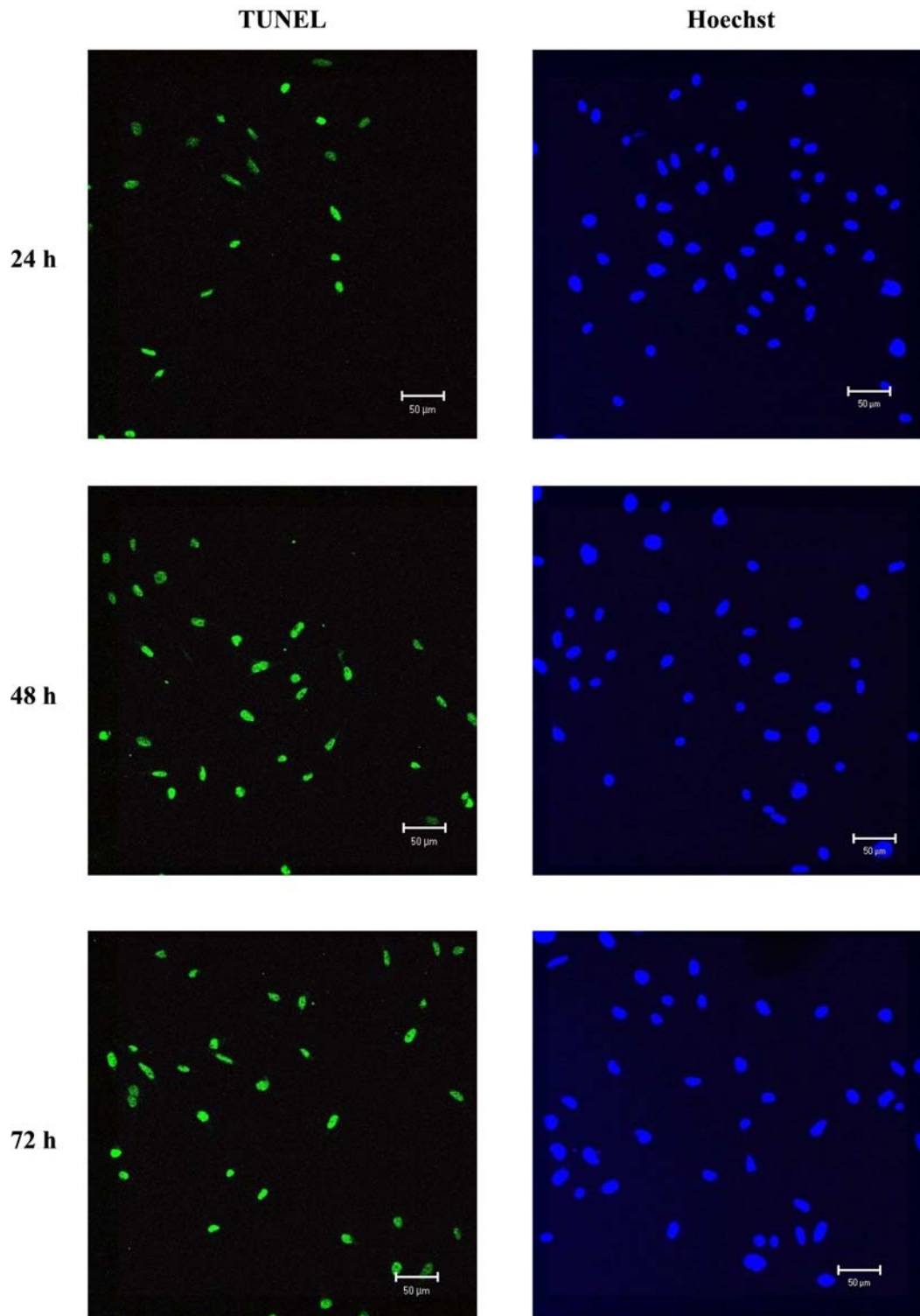


Abb. 27: Die Expression des r-SREC-Proteins führt in T-REx-HeLa-Zellen zur Apoptose. Die Expression des r-SREC-Proteins wurde durch Zugabe von $1\mu\text{g}$ Tetrazyklin/ ml Medium für die Dauer von 24 h, 48 h, 72 h induziert. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden DNA-Strangbrüche mit Hilfe von Fluorescein-dUTP markiert. Als Kontrolle der Zellzahl wurden die Zellkerne gleich behandelter Zellen mit Hoechst33342 angefärbt.

4.6.3.1 Einfluss der Co-Expression von E1A13S-Protein auf die r-SREC induzierte Apoptose

E1A-Proteine z.B. das E1A_{13S}-Protein, an das das r-SREC-Protein bindet, sind in der Lage, in den Zellzyklus einzugreifen (s. Einleitung). Im folgenden Experiment wurden in den r-SREC exprimierenden T-REx-HeLa-Zellen das Ad12 E1A_{13S}-Protein, nach Transfektion des entsprechenden Expressionsvektors, co-exprimiert. Die Transfektionseffizienz wurde mittels Immunfluoreszenz mit gegen das Flag-gekoppelt exprimierte E1A_{13S}-Protein, sowie Hoechst33342-Färbung überprüft (s. Abb. 21; Daten hier nicht gezeigt).

Wie erwartet, zeigen die T-REx-HeLa-Zellen, in denen r-SREC nicht induziert wurde, keine grüne Fluoreszenz (s. Abb. 28). Bei den für 24 h mit Tetrazyklin induzierten Zellen sind kaum grün fluoreszierende Zellen detektierbar, ebenso bei den Zellen bei denen die Expression des r-SREC-Proteins für 48 h oder 72 h induziert wurde (s. Abb. 29). Der Vergleich der Anzahl der mit Hoechst33342 angefärbten Zellkerne zeigt jedoch eine vergleichbare Menge an Zellen auf den Präparaten. Dies bedeutet, dass die Co-Expression von E1A_{13S}-Protein in den r-SREC-exprimierenden T-REx-HeLa-Zellen die r-SREC induzierte Apoptose weitgehend inhibiert.

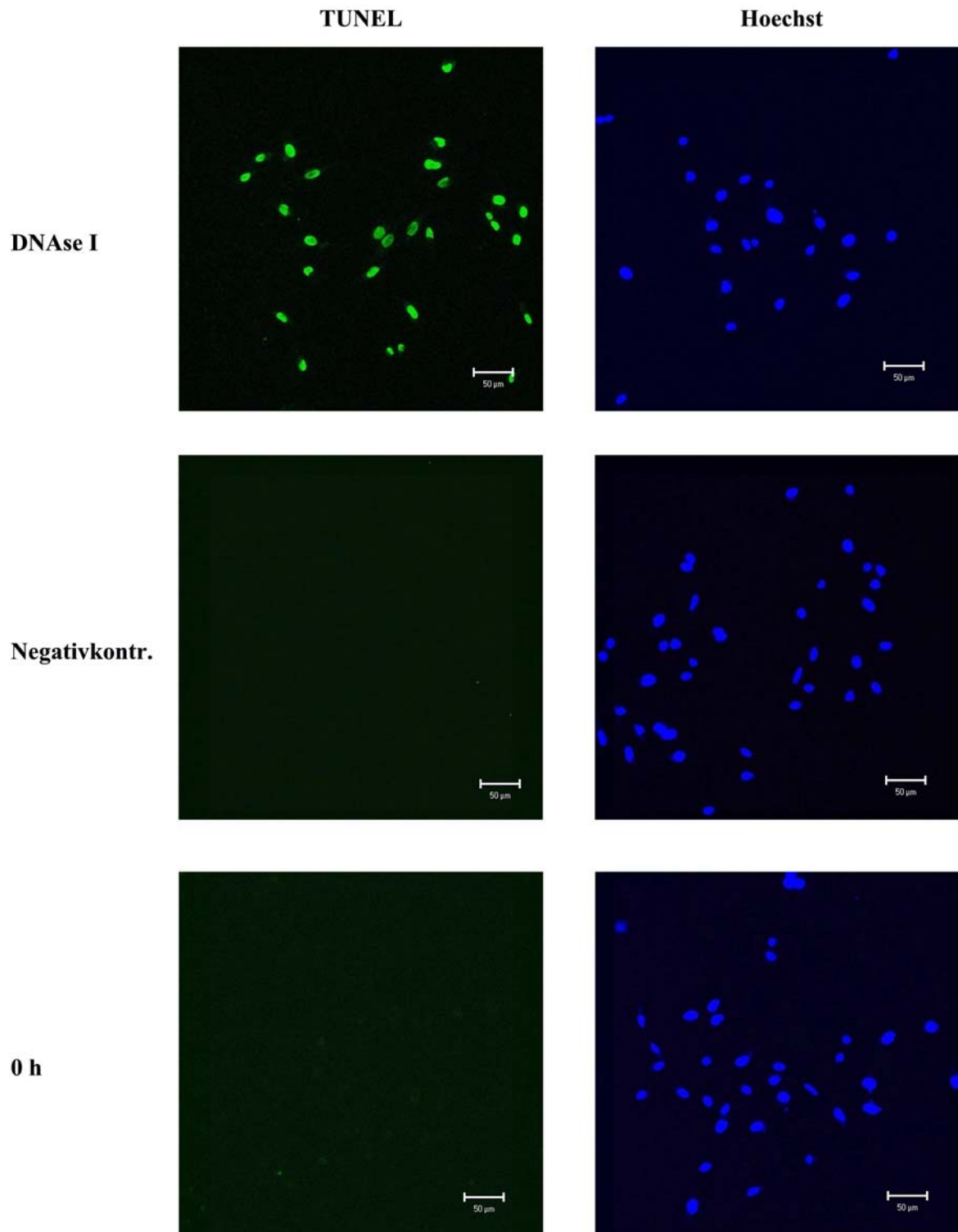


Abb. 28: Kontrollen des TUNEL-Assays von Ad12E1A_{13S}-Protein transfizierten induzierten r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen. r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für das Ad12E1A_{13S}-Flag-Fusionsprotein transfiziert. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden DNA-Strangbrüche mit Hilfe von Fluorescein-dUTP markiert. Als Positivkontrolle dienten mit DNaseI behandelte Zellen, als Negativkontrolle wurde TUNEL-Reagenz ohne TdT zugegeben, sowie nicht induzierte r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen. Als Kontrolle der Zellzahl wurden die Zellkerne gleich behandelter Zellen mit Hoechst33342 angefärbt.

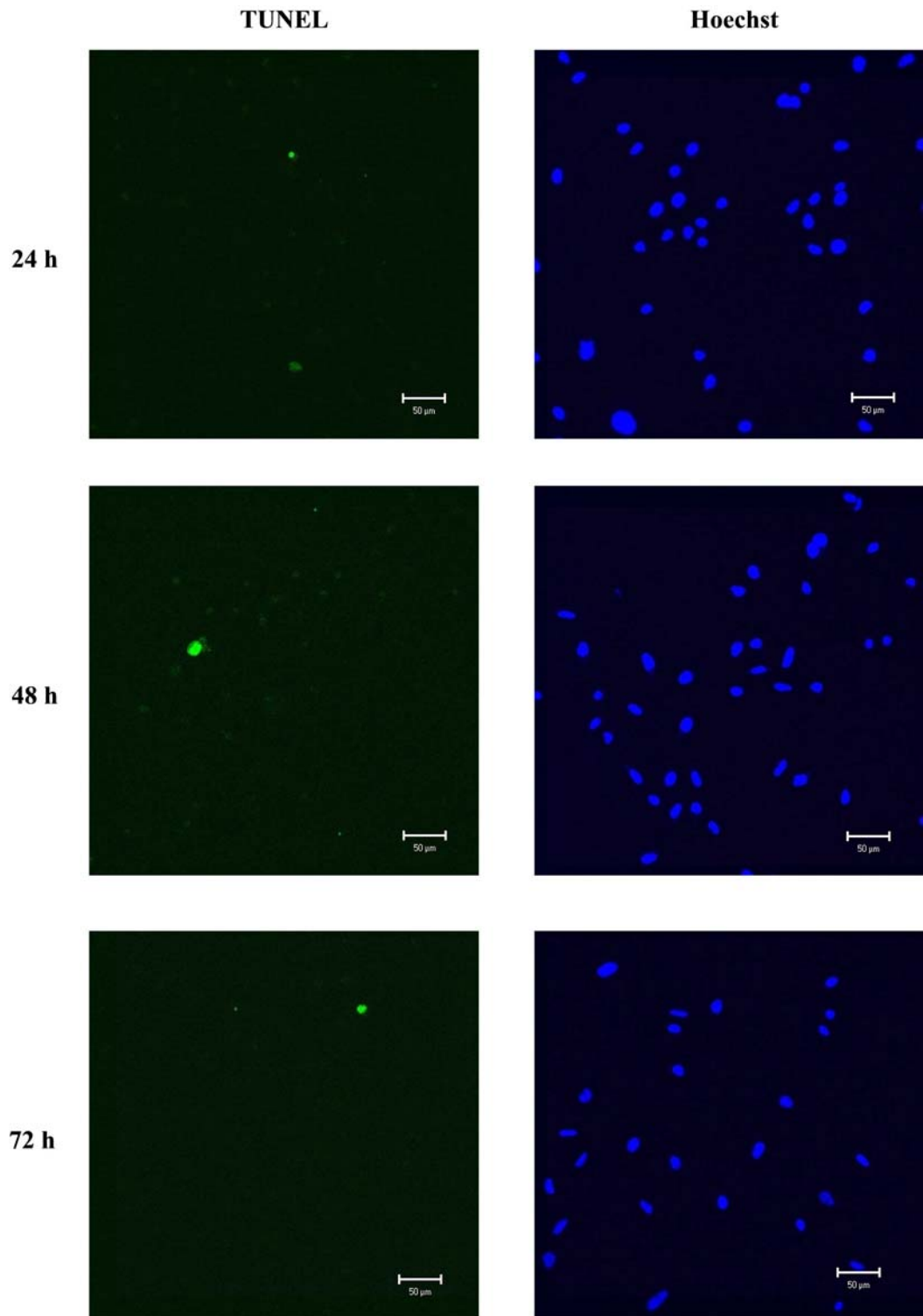


Abb. 29: Die Expression des E1A_{13S}-Proteins inhibiert die r-SREC induzierte Apoptose in T-REx-HeLa-Zellen. R-SREC-T-REx-HeLa-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für das Ad12E1A_{13S}-Flag-Fusionsprotein transfiziert und die Expression des r-SREC-Proteins durch Zugabe von 1 µg Tetrazyklin/ ml Medium für die Dauer von 24 h, 48 h, 72 h induziert. Die Expression des r-SREC-Proteins wurde durch Zugabe von 1 µg Tetrazyklin/ ml Medium für die Dauer von 24 h, 48 h, 72 h induziert. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden DNA-Strangbrüche mit Hilfe von Fluorescein-dUTP markiert. Als Kontrolle der Zellzahl wurden die Zellkerne gleich behandelte Zellen mit Hoechst33342 angefärbt.

Um die Ergebnisse des TUNEL-Assays mit einer anderen die Apoptose detektierenden Methode zu verifizieren wurde eine AnnexinV/Propidiumiodid-Färbung durchgeführt.

Die Plasmamembran von Zellen ist in Hinsicht der Verteilung von Phosphatidylserin (PS) asymmetrisch aufgebaut. Der Verlust dieser Asymmetrie ist ein frühes Zeichen der Apoptose. Phosphatidylserin, das unter normalen Bedingungen an der cytoplasmatischen Innenseite der Membran lokalisiert ist, ist bei Apoptose auch vermehrt an der nach außen gerichteten Membranseite detektierbar (Vermees *et al.*, 1995). Das Protein AnnexinV ist ein Ca^{2+} -abhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin (Vermees *et al.*, 1995). Durch die Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffes FITC an das PS können so markierte apoptotischen Zellen mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Da auch bei nekrotischen Zellen aufgrund der Permeabilisierung der Zellmembranen eine Bindung des AnnexinV möglich ist, wird gleichzeitig eine Propidiumiodid-Färbung durchgeführt, bei der sich der Farbstoff an die DNA toter Zellen anlagert. Somit ist durch die Kombination der AnnexinV-Färbung mit der Propidiumiodid-Färbung die Unterscheidung von apoptotischen Zellen und nekrotischen Zellen möglich.

r-SREC exprimierende T-REx-HeLa-Zellen in denen E1A-Proteine co-exprimiert oder nicht exprimiert wurde, wurden auf Deckgläschen ausgesät und 24 h, 48 h und 72h nach r-SREC Induktion eine Doppelfärbung mit FITC-markierten AnnexinV und Propidiumiodid durchgeführt. Zur Abschätzung der Anzahl der Zellen, die tatsächlich vorhanden waren, wurde parallel der Zellkern gleich behandelter Zellen nach Fixierung und Permeabilisierung mittels Hoechst33342 angefärbt. Als Positivkontrolle dienten Zellen die mittels 0,1 %iger Tween-Lösung permeabilisiert wurden; als Negativkontrolle T-REx-HeLa-Zellen in denen r-SREC nicht induziert wurde (s. Abb. 30). Bei den mit der Tween-Lösung permeabilisierten Zellen, ist deutlich der durch Propidiumiodid rot angefärbte Zellkern zu erkennen. Die grüne Anfärbung des Phosphatidylserins in der Zellmembran durch die Bindung des FITC-gekoppelten AnnexinV ist ebenfalls detektierbar (s. Abb. 30). Die Negativkontrolle, bei der das r-SREC-Protein nicht durch Zugabe von Tetrazyklin induziert wurde, sind keine mittels Propidiumiodid angefärbten Zellkerne detektierbar (0 h) und nur vereinzelt mittels AnnexinV angefärbte Zellen nachweisbar. Eine sehr viel deutlichere AnnexinV-Färbung ist bei T-REx-HeLa-Zellen zu erkennen, bei denen durch Tetrazyklinzugabe für 24 h, 48 h bzw. 72 h die Expression des r-SREC-Proteins induziert wurde. Da durch Propidiumiodid keine Anfärbung der Zellkerne detektiert werden konnte, kann die Nekrose der Zellen weitgehend ausgeschlossen werden.

Auch diese Experimente sprechen dafür, dass die Expression von r-SREC für die Erhöhung der Zahl apoptotischer Zellen verantwortlich ist. Die Hoechst33342-Färbung der Zellkerne zeigt, dass in allen Fällen eine vergleichbare Anzahl von Zellen bei der Auswertung pro Präparat vorlag.

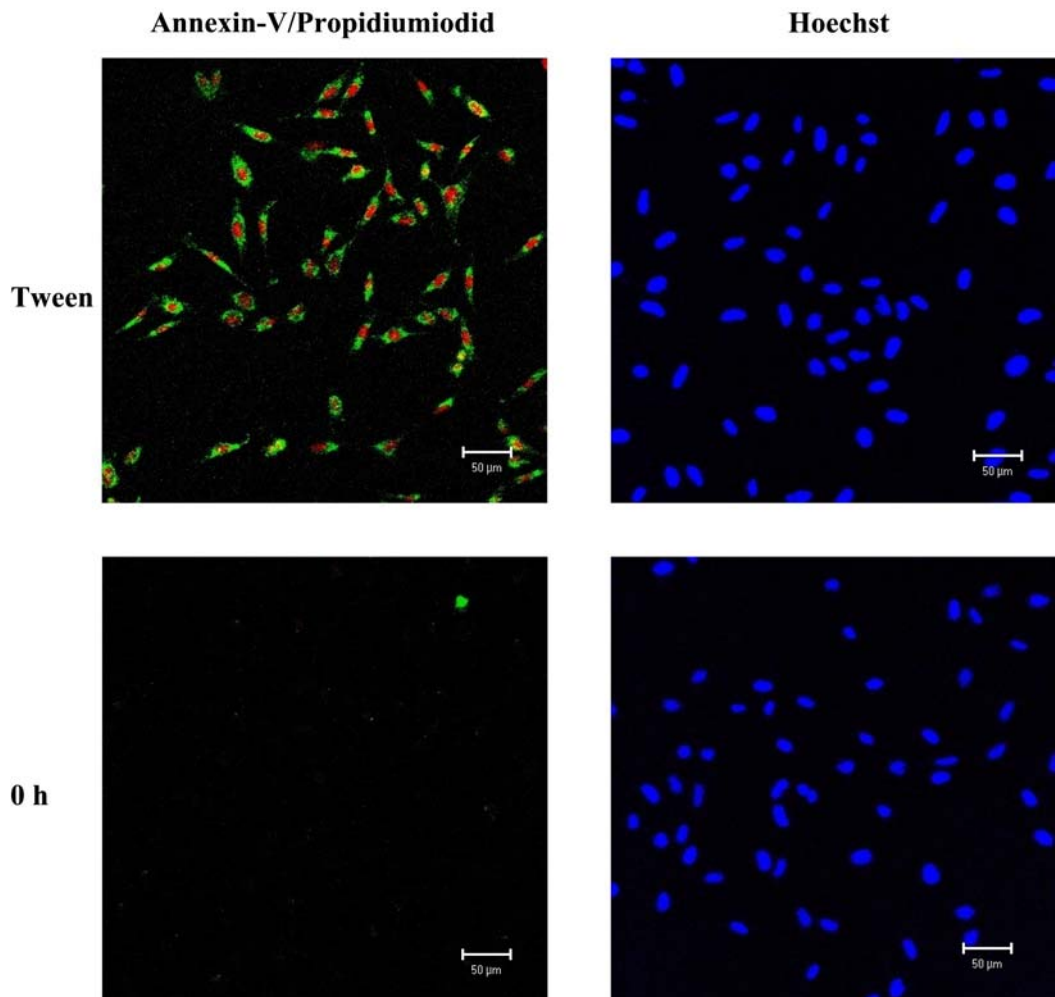


Abb. 30: Kontrollen der AnnexinV/Propidiumiodid-Färbung von induzierten r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen. Als Positivkontrolle dienten durch Inkubation mit 0,1 %iger Tween-Lösung permeabilisierte T-REx-HeLa-Zellen; als Negativkontrolle wurden nicht induzierte r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen verwendet. Es erfolgte eine Doppelfärbung von an den grün fluoreszierenden FITC-Farbstoff gekoppeltem AnnexinV zur Anfärbung des Phosphatidylserins der Zellmembranen, sowie eine Propidiumiodid-Färbung zur Anfärbung der DNA bei nekrotischen Zellen. Als Kontrolle der Zellzahl wurden die Zellkerne gleich behandelter Zellen mit Hoechst33342 angefärbt.

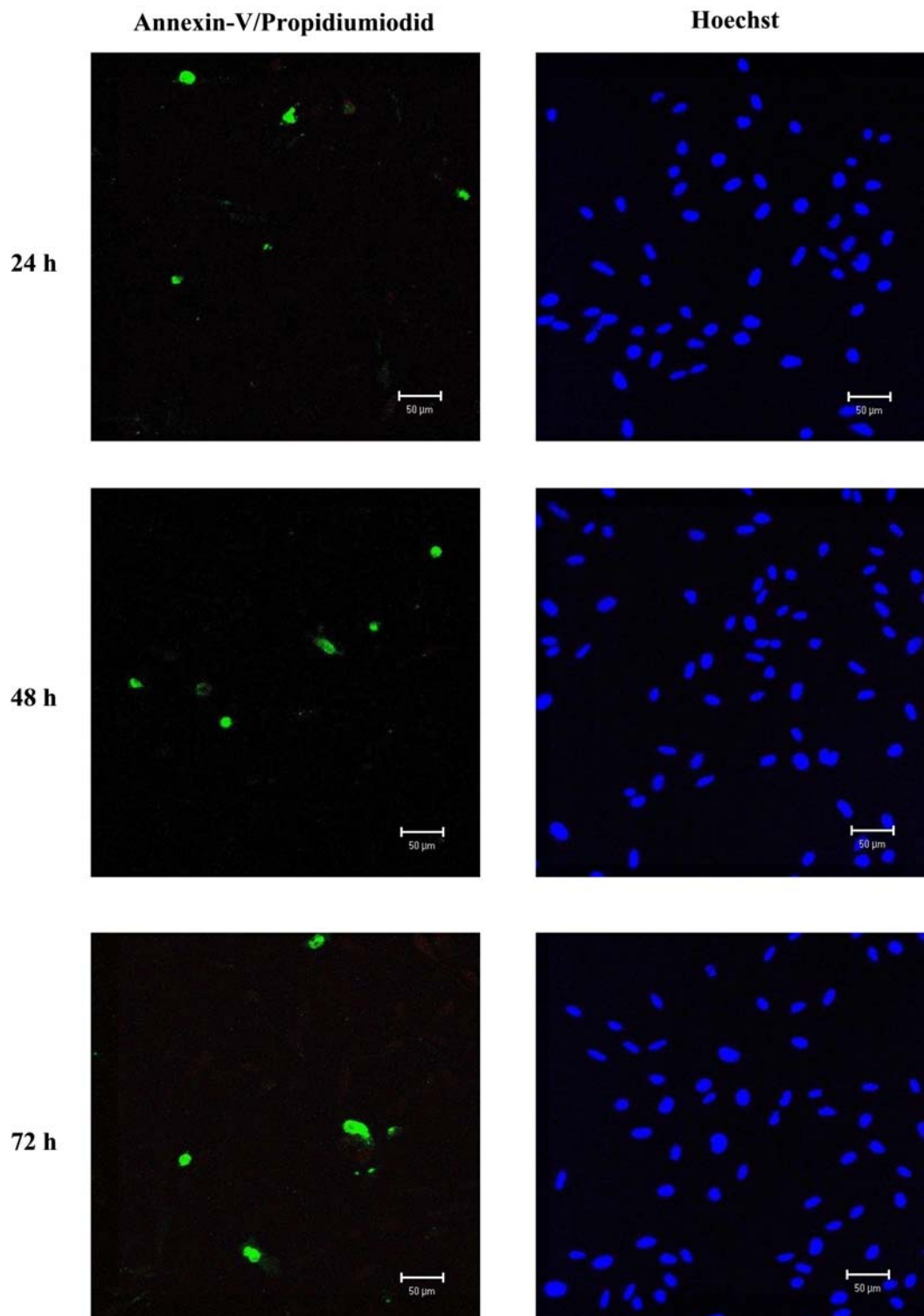


Abb. 31: Die Expression des r-SREC-Proteins führt in T-REx-HeLa-Zellen zur Apoptose von r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen. Die Expression des r-SREC-Proteins wurde durch Zugabe von 1 µg Tetrazyklin/ ml Medium für die Dauer von 24 h, 48 h, 72 h induziert. Es erfolgte eine Doppelfärbung von an den grün fluoreszierenden FITC-Farbstoff gekoppeltem AnnexinV zur Anfärbung des Phosphatidylserins der Zellmembranen, sowie eine Propidiumiodid-Färbung zur Anfärbung der DNA bei nekrotischen Zellen. Als Kontrolle der Zellzahl dienen Zellen, die der gleichen Behandlung unterzogen und deren Zellkerne mittels Hoechst33342 angefärbt wurden.

Da im TUNEL-Assay gezeigt werden konnte, dass die Co-Expression von Ad12 E1A_{13S} die r-SREC induzierte Apoptose hemmt, sollte dies mit Hilfe der AnnexinV/Propidiumiodid-Färbung überprüft werden. Zuvor wurden die Zellen durch Elektroporation mit einem Expressionsvektor, der die DNA-Sequenz des Ad12 E1A_{13S}-Proteins enthält, transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde mittels Immunfluoreszenz mit gegen das Flag-gekoppelt exprimierte E1A_{13S}-Protein, sowie Hoechst33342-Färbung überprüft (s. Abb. 21; Daten hier nicht gezeigt).

Wie Abb. 33 eindeutig zeigt, ist die Anzahl der durch AnnexinV-angefärbten r-SREC exprimierenden T-REx-HeLa-Zellen bei gleichzeitiger Co-Expression von E1A_{13S}-Proteinen deutlich verringert. Es sind nur wenige apoptotische Zellen nachweisbar, deren Anzahl mit zunehmender r-SREC Expressionsdauer nicht ansteigt.

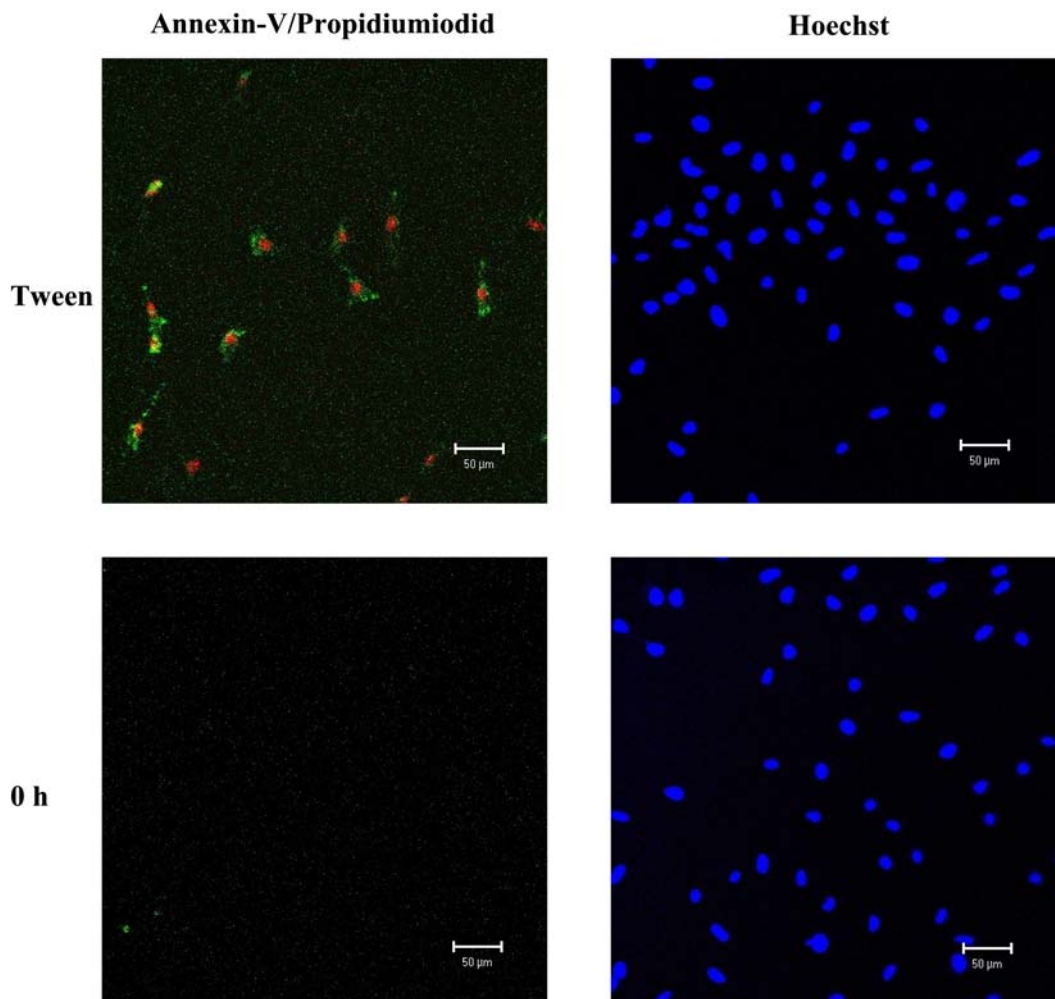


Abb. 32: Kontrollen der AnnexinV/Propidiumiodid-Färbung von Ad12 E1A_{13S} transfizierten r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen. R-SREC-T-REx-HeLa-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für das Ad12E1A_{13S}-Flag-Fusionsprotein transfiziert. Als Positivkontrolle dienten durch Inkubation mit 0,1 %iger Tween-Lösung permeabilisierte T-REx-HeLa-Zellen; als Negativkontrolle wurden nicht induzierte r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen verwendet. Es erfolgte eine Doppelfärbung von an den grün fluoreszierenden FITC-Farbstoff gekoppeltem AnnexinV zur Anfärbung des Phosphatidylserins der Zellmembranen, sowie eine Propidiumiodid-Färbung zur Anfärbung der DNA bei nekrotischen Zellen. Als Kontrolle der Zellzahl wurden die Zellkerne gleich behandelte Zellen mit Hoechst33342 angefärbt.

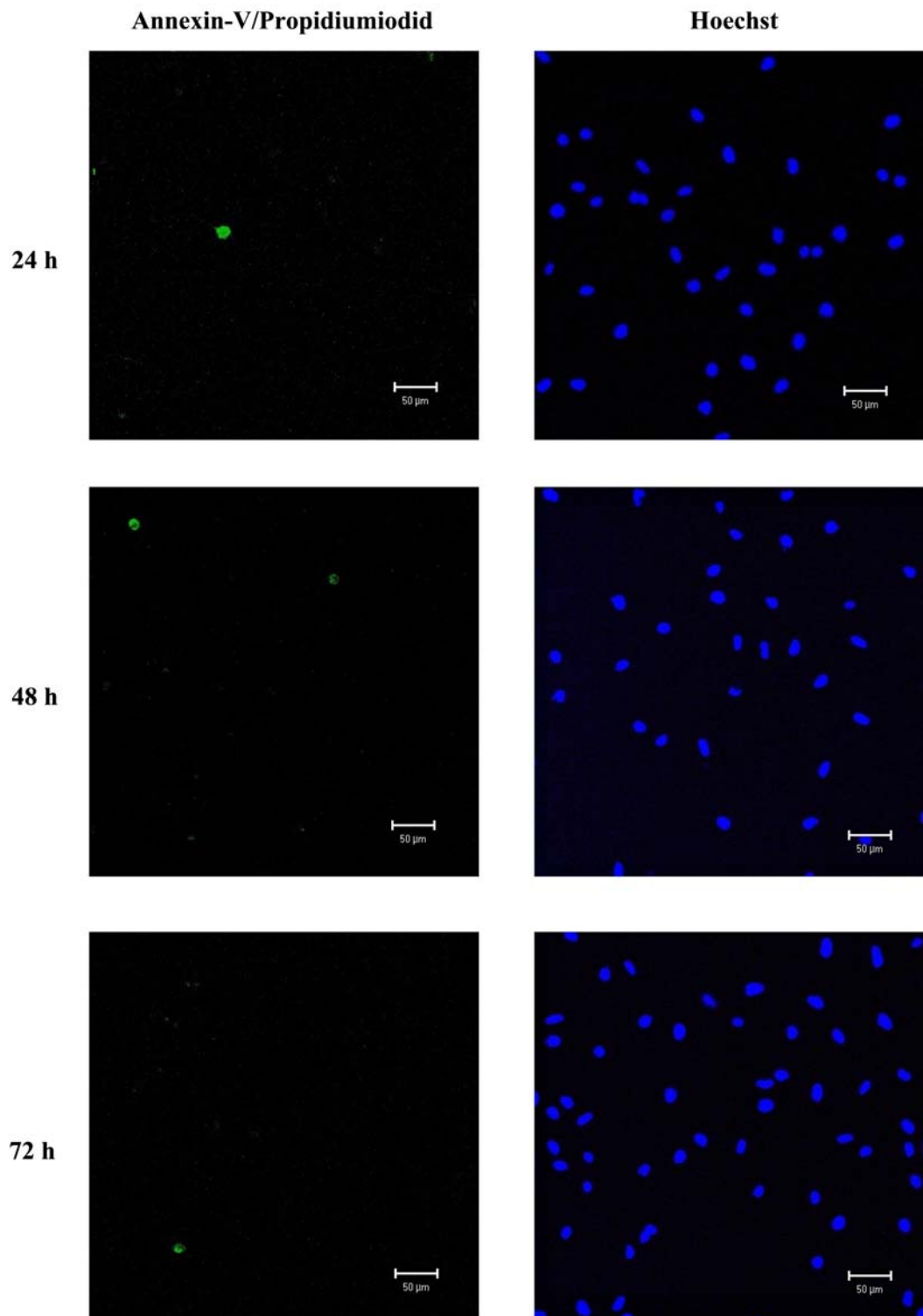


Abb. 33: AnnexinV/ Propidiumiodid-Färbung von Ad12 E1A_{13S} transfizierten r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen. R-SREC-T-REx-HeLa-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für das Ad12E1A_{13S}-Flag-Fusionsprotein transfiziert. Die Expression des r-SREC-Proteins wurde durch Zugabe von 1 µg Tetracyclin/ ml Medium für die Dauer von 24 h, 48 h, 72 h induziert. Es erfolgte eine Doppelfärbung von an den grün fluoreszierenden FITC-Farbstoff gekoppeltem AnnexinV zur Anfärbung des Phosphatidylserins der Zellmembranen, sowie eine Propidiumiodid-Färbung zur Anfärbung der DNA bei nekrotischen Zellen. Als Kontrolle der Zellzahl dienten Zellen, die der gleichen Behandlung unterzogen und deren Zellkerne mittels Hoechst33342 angefärbt wurden.

5. Diskussion

Adenovirale E1A-Proteine sind in der Lage, in eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie der Zellzykluskontrolle, der Differenzierung und der Apoptose, einzugreifen. Hinweise auf weitere Funktionen der E1A-Proteine kann die Identifikation neuer zellulärer Interaktionspartner liefern. Im Rahmen der Suche nach zellulären Interaktionspartnern der CR2-S-CR3-Region des E1A-Proteins mit Hilfe des Hefe SOS-„Two-Hybrid“-Systems wurde in unserer Arbeitsgruppe das r-SREC-Protein als neuer Interaktionspartner des E1A-Proteins identifiziert. Über die Funktion des r-SREC-Proteins lagen jedoch noch keine Daten vor. Das humane Homolog REAM dieses Proteins (Oyama *et al.*, 2000) ist auf dem Chromosom 8p 21.3-22 lokalisiert, einer Region die Deletionen bei einer Vielzahl von Tumoren aufweist und daher als Lage eines Tumorsuppressorgens angenommen wurde. Da Oyama und Mitarbeiter außerdem eine verminderte Expression des REAM-Gens in Tumorgeweben nachweisen konnten, nahmen sie an, dass es sich bei REAM um ein putatives Tumorsuppressorgen handeln könnte.

Wie das humane REAM-Protein besitzt das r-SREC-Protein neben einer Reihe von putativen Transmembran-Domänen eine cysteinreiche DHHC-Zinkfinger-Domäne, dessen Funktion noch weitgehend ungeklärt ist. Mit Ausnahme erster Untersuchungen, die zeigten, dass das r-SREC-Protein in der Lage ist, an E1A-Proteine von Ad12 zu binden und höchstwahrscheinlich cytoplasmatisch lokalisiert vorliegt, lagen zu Beginn meiner Arbeit keine Daten über das r-SREC-Protein vor. Ziel meiner Arbeit war es daher, das r-SREC-Protein in Hinsicht seiner Interaktionen mit den E1A-Proteinen von Ad12, seiner Lokalisation in der Zelle und möglichen Funktionen näher untersuchen.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- (1) Es wurde bestätigt, dass zur Bindung von Ad12 E1A an das r-SREC-Protein der N-Terminus in Kooperation mit der konservierten Region 1 (aa 1-79) und/oder die konservierte Region 2 essentielle Interaktionsdomänen darstellen. Eine spezifische Domäne des r-SREC-Proteins, die für die Interaktion mit E1A-Proteinen notwendig ist, ließ sich bisher nicht eindeutig nachweisen.
- (2) Lokalisationsstudien mit dem r-SREC-Protein und den r-SREC-Proteinmutanten haben in Ab- und Anwesenheit von Ad12 E1A-Proteinen gezeigt, dass (a) das r-SREC-Protein im Cytoplasma, vermutlich am endoplasmatischen Retikulum

lokalisiert ist und (b) die Co-Expression von E1A-Proteinen führt nicht zu einer Lokalisationsänderung des r-SREC-Proteins. Während das r-SREC-WT-Protein und viele der verwendeten r-SREC-Mutanten, über das ganze Cytoplasma verteilt vorlagen, wurde das Proteine der Mutante r-SREC aa 128-366 in einem bestimmten Bereich nahe des Zellkerns konzentriert detektiert. Die Proteine der Mutanten r-SREC aa 1-47 bzw. r-SREC aa 48-128 lagen in kleinen abgegrenzten Bereichen des Cytoplasmas („cytoplasmic bodies“) vor.

- (3) Die Expression des in T-REx-HeLa-Zellen exogen eingeführten r-SREC-Proteins induziert Apoptose, die mittels TUNEL-Assay und AnnexinV/Propidiumiodid-Färbung nachgewiesen werden konnte. Die Co-Expression von Ad12 E1A_{13S} führt zur Repression der r-SREC induzierten Apoptose. Diese Experimente wiesen darauf hin, das r-SREC in eine Signalkaskade der möglicherweise Stress-induzierten Apoptose involviert ist.
- (4) Erste Genchip-Analysen von Zellen, in denen r-SREC exogen exprimiert wird, im Vergleich mit Zellen in denen r-SREC nicht exprimiert wird, geben Hinweise darauf, dass möglicherweise auch Protein Kinase C regulierte und an der Calcium-Homöostase beteiligte Gene mit r-SREC-Funktionen in Zusammenhang stehen könnten.

5.1 Charakterisierung der Proteininteraktionsdomänen von Ad12 E1A13S und r-SREC mittels GST-„Pull-Down“- Experimenten

Untersuchungen der Interaktionsdomänen zwischen dem adenoviralen E1A- und dem r-SREC-Protein hatten gezeigt, dass die Bindung des r-SREC-Proteins an die konservierte Region 2 und/oder den N-Terminus in Kombination mit der konservierten Region 1 des E1A-Proteins erfolgt. Es konnte nachgewiesen werden, dass alle bisher detektierten cytoplasmatisch lokalisierten Interaktionspartner der E1A-Proteine, an den N-Terminus der E1A-Proteine binden. Es handelt sich dabei um die regulatorische Untereinheit RII α der Protein Kinase A (Fax *et al.* 2001), um RACK1 (Mochly-Rosen, 1995), um Sprouty 1/2 , einem Inhibitor des Ras-Raf-MAP-Kinase Signaltransduktionsweges (Esche, unpubliziert) und um die S4- und S8-ATPasen der 19S Untereinheit der Proteasomen (Turnell *et al.*, 2000). Da zumindest einige dieser oben genannten zellulären Proteine ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert sind, muss angenommen werden, dass E1A-Proteine, die bisher als klassische Transkriptionsfaktoren beschrieben wurden, zumindest zum Teil auch im Cytoplasma spezifische Funktionen ausüben. Übereinstimmend mit dieser Vermutung sind Daten von

Madison und Mitarbeitern zeigten 2000, dass die Acetylierung des Lysinrestes 239 am carboxyterminalen Ende des E1A-Proteins zu einer Anreicherung von E1A-Proteinen im Cytoplasma führt, da die am Lysinrest 239 acetylierten E1A-Proteine nicht mehr in der Lage sind, an das Protein Importin- α 3 zu binden.

Die Bestimmung von r-SREC-Proteindomänen, die zur Bindung an E1A-Proteine notwendig sind, war nicht möglich. Sowohl die aminoterminal- als auch die carboxyterminale Hälfte des r-SREC-Proteins binden an das E1A_{13S}-Protein. Die kleineren r-SREC-Polypeptide ließen sich aufgrund einer zu geringen Anzahl [³⁵S]-markierbarer Aminosäuren nur sehr schlecht nachweisen. Dies hatte zur Folge, dass sich die GST-„Pull-Down“-Analysen nicht reproduzierbar auswerten ließen. Der Versuch, das r-SREC-Protein als GST-Fusionsprotein in *E. coli* zu exprimieren, schlug auch fehl, da es eine stark toxische Wirkung in Bakterien besitzt.

5.2 Vergleich der Proteinsequenz von r-SREC mit anderer Proteinen, die eine DHHC- und Transmembranregion besitzen

Vergleiche der Proteinsequenz des r-SREC-Proteins mit Computerdatenbanken zeigten, dass das Protein neben vier putativen Transmembranregionen eine DHHC-Zinkfinger-Domäne enthält. Diese Domäne ist hoch konserviert und in einer Vielzahl von Proteinen vorhanden. Die Abb. 34 zeigt den Sequenzvergleich einiger Proteine, die diese DHHC-Domäne enthalten und über deren Funktion erste Hinweise vorliegen.

R-SREC	AIRYCDRCRLIKPDRCHHCSVCDKCTLKMDHHCWPVNNCVGFNSYKFFLLFLAYSLLYCLF	184
SERZ1	VIYKCPKCCCIKPERAHHCSICKRCIRKMDHHCWPVNNCVGEKNQRFVLFMTMYIALSSIH	188
GODZ	VVYKCPKCCSIKPDRAHHCSTCKRCIRKMDHHCWPVNNCVGENNQKYFVLFMTMYIALISLH	185
Erf2p	TIKYCPSCRIWRPPRSSHCSTCNVCMVVDHHCIVVNNCIGKRNRYFFLIFLLGAILSSVI	232
Akr1p	TKNFCIETWIRKPLRSKFSPLNNAVVARFDHYCPWIFNDVGLKNHKAFIFFITLMESGIFT	528
Aph2	TVSICKKCIYPKPARTHHCSICNRCVCLKMDHHCWLNNCVGHYNHRYFFSFCFFMTLGCVY	213

Abb. 34: Vergleich der Aminosäuresequenzen der DHHC-Domäne verschiedener Proteine unterschiedlicher Spezies. Es wurde ein Sequenzvergleich verschiedener Proteine, die eine DHHC-Domäne enthalten, mit Hilfe des Computerprogrammes CLUSTAL W durchgeführt. Dargestellt ist der Ausschnitt des Sequenzvergleiches im Bereich der DHHC-Domäne. Die restliche Sequenz weist keine Homologien zwischen den einzelnen Proteinen auf. Es wurden die Aminosäuresequenzen der Proteine SERZ1 (308 aa, *R. norvegicus*); GODZ (299 aa, *M. musculus*); Aph2 (361 aa, *M. musculus*); R-SREC (366 aa; *R. norvegicus*), Erf2p (352 aa; *S. cerevisiae*) und Akr1p (764 aa; *S. cerevisiae*) auf homologe Bereiche hin untersucht. Die Homologien sind wie folgt gekennzeichnet: ▲ = konserviert; ● = semi-konserviert; ■ = Aminosäurereste in allen Sequenzen des Sequenzvergleichs identisch; DHHC = DHHC-Domäne

Der Grad an Konservierung der DHHC-Domäne ist sehr hoch. Bei den hier verglichenen Proteinen sind 12 aa in allen Sequenzen des Sequenzvergleiches identisch (als blaues Quadrat gekennzeichnet), 6 aa sind konserviert (als oranges Dreieck gekennzeichnet) und 7 aa sind semi-konserviert (als roter Kreis gekennzeichnet). Dieser hohe Grad an Konservierung lässt vermuten, dass diese Domäne eine wichtige Funktion in der Zelle ausübt. Einzelne Aminosäureaustausche dieser hoch konservierten Aminosäuren der DHHC-Domäne führen beim Erf2-Protein zum vollständigen Funktionsverlust (Bartels *et al.*, 1999). Die oben genannten Proteine weisen untereinander keine weiteren homologen Domänen, mit Ausnahme einer unterschiedlichen Anzahl an Transmembrandomänen, auf.

Die größte strukturelle Ähnlichkeit mit r-SREC besitzt das Protein Aph2 (Abl-philin 2), das über seinem N-Terminus mit dem Protein c-Abl interagiert (Li *et al.*, 2002). Das Protein c-Abl fungiert als eine Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die durch DNA-Schäden, Wachstumsfaktoren, Zelladhäsion mit extrazellulären Matrixproteinen sowie Kinasen der Familie *Src* aktiviert wird (Wang, 2000; Van Etten, 1999, Lewis *et al.*, 1996) und sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma lokalisiert ist.

Aph2 ist wie das r-SREC-Protein cytoplasmatisch, hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum, lokalisiert. Die Sequenzen, die für die Lokalisation im ER verantwortlich sind, ist der N-Terminus sowie die DHHC-Domäne von Aph2. Li und Mitarbeiter vermuten, dass das Protein Aph2 in die ER-Stress induzierte Apoptose involviert ist, in der sein Interaktionspartner c-Abl ebenfalls eine große Rolle spielt.

5.3 Lokalisation des r-SREC-Proteins in der Zelle

Lokalisationsstudien mit Immunfluoreszenzmikroskopie des r-SREC-WT-Proteins und r-SREC-Proteinenmutanten zeigten, dass das r-SREC-Protein cytoplasmatisch, vermutlich am endoplasmatischen Retikulum, lokalisiert ist. Während das r-SREC-WT-Protein und einige der Mutanten (r-SREC aa 1-127, aa 70-127, aa 128-174 und aa 167-366) über das gesamte Cytoplasma verteilt vorlagen, wurde die Mutante r-SREC aa 128-366 in einem bestimmten Bereich des Cytoplasmas nahe des Zellkerns konzentriert detektiert. Die Mutanten r-SREC aa 1-47 und r-SREC aa 48-127 sind nur in kleinen abgegrenzten Bereichen („cytoplasmic bodies“) im Cytoplasma nachweisbar. Anscheinend sind die N-terminal von der DHHC-Domäne gelegenen Aminosäuresequenzen (inklusive der Transmembrandomänen) wichtig für die korrekte Lokalisation des r-SREC-Proteins im Cytoplasma. Die Bedeutung der N-terminal von der DHHC-Domäne gelegenen Bereiche für die Lokalisation des Proteins

werden durch Untersuchungen von Li *et al.*, 2002 bestätigt. Sie zeigten, dass die Mutante die aus den aa 226-361 des Aph2-Proteins besteht (Bereich TM3 bis C-Terminus), über das gesamte Cytoplasma verteilt vorliegt, wohingegen andere Fragmente von Aph2 wie die Aminosäuren 1-226 (enthält TM1, 2, 3 und DHHC Domäne), sowie die Aminosäuren 150-361 des Aph2-Proteins (DHHC – C-Terminus) und eine Mutante, bei der die DHHC-Domäne deletiert wurde (delta aa 167-219), eine starke perinucleäre Lokalisation zeigen.

Die Lokalisation des r-SREC-WT-Proteins in Zellen (T-REx-HeLa-Zellen), die E1A co-exprimieren bzw. in Ad2 E1A transformierten 293-Zellen, sowie in Ad12E1A transformierten HEK12-Zellen unterschied sich nicht von der in Zellen, die E1A-Proteine nicht exprimieren. Die Interaktion von r-SREC mit E1A-Proteinen scheint somit nicht mit einer Änderung der Lokalisation von r-SREC einher zu gehen. Die Interaktion der regulatorischen Untereinheit RII α der Protein Kinase A (PKA) mit dem E1A_{12S}-Protein führt zu einer Translokation der RII α -Untereinheit vom Cytoplasma in den Zellkern (Fax *et al.*, 2001).

5.4 Die Expression von exogenem r-SREC-Protein induziert Apoptose

Die Infektion einer Zelle durch einen Virus aktiviert Stress-Signalwege der Zelle, die zu Apoptose der Zelle führen können. Diese Initiation der Apoptose erfolgt aufgrund eines Signalkonflikts, da gleichzeitig virale Proteinfunktionen die infizierte Zelle durch Deregulation des Zellzyklusses zur Proliferation anregen, wohingegen sie von Nachbarzellen das Signal erhält, nicht zu proliferieren. Viren haben daher diverse Strategien entwickelt, um die Apoptoseantwort der Zelle zu hemmen und die Bildung von Virusnachkommen sicher zu stellen (White *et al.*, 2000; Chinnadurai *et al.*, 1998; Roulson *et al.*, 1999). Die Apoptoseantwort ist generell auf die Aktivität von Ad E1A Proteinfunktionen zurückzuführen und kann sowohl abhängig als auch unabhängig vom Tumorsuppressorprotein p53 erfolgen. (Debbas und White, 1993; Subramanian *et al.*, 1995, Teodoro *et al.*, 1995). Anti-apoptotische Funktionen werden durch die Ad E1B-Gene kodiert, wobei das 19K Protein ein funktionelles und strukturell homologes Protein zum Bcl-2-Protein darstellt (Rao *et al.*, 1992).

Zu der Vielzahl von nachgewiesenen Mechanismen, die zur Induktion der Apoptose führen, zählen beispielsweise die Aktivierung von Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptoren (z.B. durch TNF- α), die Induktion von Apoptose in Mitochondrien (z.B. durch freie Radikale oder Wasserstoffperoxid) mit nachfolgender Freisetzung von Cytochrom C oder der Hemmung des endoplasmatischen Retikulums durch Störung der zellulären Calcium-

Homöostase. Alle diese Prozesse führen letztendlich zur Aktivierung von Caspasen, einer Familie von Cystein-abhängigen Aspartat-spezifischen Proteasen. Caspasen sind sowohl an der Transduktion des Apoptosesignals in der Zelle z.B. nach TNF- α -Rezeptoraktivierung (Caspase 8) oder Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien (Caspase 9), als auch an der Ausführung des Apoptose induzierten Zelltods beteiligt (z.B. Caspase 3, -6, -7). Neben den Caspasen existieren eine Reihe von weiteren Proteinen, die als Regulatoren in der Apoptosekaskade fungieren, beispielsweise Proteine der Bcl-2 Familie, die sowohl pro- als auch anti-apoptotisch wirken können.

Es wird heute vermutet, dass das ER die Apoptose sowohl durch eine Sensibilisierung der Mitochondrien in Hinblick auf eine Vielzahl von extrinsischen und intrinsischen Todesstimulantien, als auch durch die Initialisierung von Todessignalen durch das ER selbst auslösen kann (Breckenridge *et al.*, 2003). Mitglieder der Bcl-2 Familie, die unter anderem an den Membranen des ER lokalisiert sind, sind in der Lage, die ER-Calcium-Homöostase, möglicherweise durch eine Beeinflussung der Permeabilität der Membran, zu beeinflussen. Diese Freisetzung von Calcium durch das ER spielt eine Schlüsselrolle in einer Vielzahl an Apoptose Modellen. Die Menge des freigesetzten Calciums aktiviert möglicherweise direkt Todeseffektoren oder beeinflusst die Sensitivität der Mitochondrien auf apoptotische Signale. Zu der Vielzahl der im ER lokalisierten Proteine, die an der Regulation der Apoptose beteiligt sind, zählt die Caspase 12, die in der cytosolischen Phase des ER lokalisiert ist und in der ER-Stress-Antwort als ein Signalmolekül fungiert (Nakagawa *et al.*, 2000, Nakagawa und Yuan 2000). Der genaue Mechanismus der Caspase-12 Aktivierung ist bislang jedoch noch unklar.

Der Einfluss von ER-Stress auf die Mitochondrien und die damit verbundene Freisetzung von Cytochrom C ist abhängig von Funktionen der Tyrosin-Kinase c-Abl (Ito *et al.*, 2001). Ein Interaktionspartner des c-Abl-Proteins ist Aph2, das ähnliche Strukturelemente wie das r-SREC-Protein aufweist und an der durch Stress ausgelösten Apoptose des endoplasmatischen Retikulums beteiligt ist. Daher wurde überprüft, ob das r-SREC-Protein ebenfalls mit der Apoptose im Zusammenhang steht. Da beim Aph2-Protein eine Lokalisationsänderung nach Induktion des ER-Stresses vom endoplasmatischen Retikulum zum Zellkern beobachtet wurde, sollte zunächst überprüft werden, ob dies auch beim r-SREC-Protein nachzuweisen ist. Bei r-SREC-T-Rex-HeLa-Zellen wurde, neben der Expression des r-SREC-Proteins, durch Zugabe verschiedener Agenzien (Thapsigargin, Tunicamycin, DTT) Stress des endoplasmatischen Retikulums induziert. Es konnte jedoch keine Lokalisationsänderung nach der Induktion von ER-Stress detektiert werden. Da der Stress des endoplasmatischen Retikulums nicht zwangsläufig zu einer Lokalisationsänderung des

beteiligten Proteins, jedoch immer zur Auslösung von Apoptose führt, wurden verschiedene Apoptose-Assays durchgeführt.

Daher wurde ein TUNEL-Assay unter Verwendung von r-SREC-T-REx-HeLa-Zellen durchgeführt, in denen die Expression eines exogen eingebrachten r-SREC-Proteins induziert worden war. Es zeigte sich, dass mit zunehmender Dauer der r-SREC-Proteinexpression die Anzahl der apoptotischen Zellen zunahm. Dies konnte durch eine AnnexinV-Färbung gekoppelt mit einer Propidiumiodid-Färbung bestätigt werden. Durch die gleichzeitige Färbung mit Propidiumiodid konnte zusätzlich gezeigt werden, dass es sich beim durch das r-SREC-Protein induzierten Zelltod nicht um Nekrose, sondern, wie angenommen, um Apoptose handelt.

Durch die Co-Expression des adenoviralen E1A_{13S}-Proteins ließ sich die durch die exogene r-SREC-Expression induzierte Apoptose inhibieren. Dies lässt vermuten, dass die Interaktion von E1A-Proteinen mit r-SREC die Apoptose fördernden Funktionen von r-SREC weitgehend inhibiert. Geplante Experimente unter Verwendung geeigneter E1A-Mutanten, die r-SREC nicht mehr binden können, sollen bestätigen, dass E1A-Funktionen die r-SREC-induzierte Apoptose hemmen. Bisher wurde angenommen, dass E1A-Proteine die Apoptose induzieren, wohingegen den E1B-Proteinen unter anderem Apoptose inhibierende Funktionen zugesprochen wurden.

Studien von Schmeiser *et al.*, zeigten jedoch, dass das r-SREC-Protein nicht nur Apoptose inhibierende Wirkungen hat, sondern außerdem als Substrat für Caspasen dient. Sie konnten zeigen, dass die Proteine Ad2 E1A_{13S} und Ad12 E1A_{13S} durch der Caspase 3 degradiert werden, wohingegen das Protein Ad12 E1A_{12S} durch die Caspase 7 degradiert werden.

Der ER-Stress ist ebenfalls an Caspase gekoppelt, allerdings wie schon beschrieben an die Caspase 12. Es sollen sich daher Experimente anschließen, die den Einfluss der r-SREC-Expression auf die Aktivität von Caspasen, insbesondere der Caspasen, 3, 7 und 12, überprüfen.

5.5 Ein Interaktionspartner des r-SREC-Proteins konnte mit Hilfe des Hefe SOS-„Two-Hybrid“-Systems nicht detektiert werden

Das SOS-„Two-Hybrid“-System wurde in unserer Arbeitsgruppe ursprünglich zur Identifikation von zellulären Proteinen, die mit adenoviralen E1A-Proteinen interagieren, eingesetzt. Gegenüber dem konventionellen Gal4-„Two-Hybrid“-System hat es den großen

Vorteil, dass man als Köder auch Proteine verwenden kann, die selbst transkriptionell aktive Domänen besitzen.

Dieses System, das bereits zur Identifikation des E1A-Protein bindenden zellulären Proteins r-SREC verwendet worden war, wurde ebenfalls zur Identifikation zellulärer Interaktionspartner des r-SREC-Proteins eingesetzt. Es wurde die gleiche cDNA-Bank verwendet, in der r-SREC-Sequenzen erstmals detektiert wurden und die Produkte von ca. $5,42 \cdot 10^7$ Plasmiden auf die Interaktion mit dem r-SREC-Protein hin getestet. Von ursprünglich 29 Klonen, die nach mehreren Replika-Plattierungen die Selektionsbedingungen erfüllten, war, nach erneuter Co-Transformation des enthaltenen cDNA-Bank Plasmids und des Köderproteins r-SREC, bei 6 Klonen kein Galaktose-abhängiges Wachstum bei der restriktiven Temperatur von 36 °C detektierbar. Bei den übrigen 23 Klonen wurde ein selektives Wachstum unabhängig vom Köderprotein nachgewiesen. Es wurde mit Hilfe der PCR unter Verwendung Ras-spezifischer Primer, sowie exemplarisch durch PCR gezeigt, dass die in diese Klone transformierten Plasmide der cDNA-Bank Ras-Gen spezifische Sequenzen enthielten. Diese Anzahl an falsch positiven Klonen trotz der Verwendung des mGAP-exprimierenden Plasmids zeigt, dass durch mGAP die Anzahl der falsch positiven Klonen zwar reduziert, jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden kann. Ein Interaktionspartner des r-SREC-Proteins konnte jedoch nicht detektiert werden. Dies kann mehrere mögliche Ursachen haben. (1) Die cDNA der embryonale Rattenhypophysen-cDNA-Bank wurde mit einem „random-Primer“ und einem oligo dT-Primer aus mRNA von embryonalen Ratten-Hypophysenzellen hergestellt. Sie sollte vor allem 3'-Sequenzen der mRNA aus den embryonalen Ratten-Hypophysenzellen enthalten und daher vor allem carboxyterminale Aminosäuresequenzen von Proteinen exprimieren. Es könnte sein, dass weiter aminoterminal gelegene Domänen von Proteinen, die Interaktionsmotive für die Bindung an r-SREC darstellen, von dieser cDNA-Bank nicht exprimiert werden. Deshalb sollen anders gepriimte cDNA-Banken aus r-SREC hoch exprimierenden Geweben eingesetzt werden. (2) Aufgrund der Amplifikation der cDNA-Bank in *E. coli* kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Amplifikation der Plasmide zu Punktmutationen, beispielsweise zur Generierung von Stopkodons, geführt haben könnte. Ein Verlust von cDNA-Bank Plasmiden aufgrund der Amplifikation ist ebenfalls nicht auszuschließen. (3) Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass ein Protein, das z. B. mit r-SREC interagiert, in Hefen toxisch ist und daher nicht exprimiert wird. R-SREC selbst konnten in Bakterien nicht exprimieren werden, da r-SREC-Funktionen für *E. coli* anscheinend toxisch sind. (4) Die Größe des verwendeten SOS-Proteins (150 kDa) kann zu Problemen führen, wenn Vollängenproteine als Köder verwendet

werden. Dieses Probleme könnten durch die Verwendung des Ras-, „Two-Hybrid“-Systems an Stelle des SOS-, „Two-Hybrid“-Systems behoben werden (Broder *et al.*, 1998), dessen Funktionsprinzip dem SOS-, „Two-Hybrid“-System sehr ähnlich ist, jedoch auf einer für die Ras-Funktion essentiellen Translokation des Ras-Proteins an die Plasmamembran basiert (Hancock *et al.*, 1989; Magee *et al.*, 1999).

5.6 Erhalt von Hinweisen auf mögliche r-SREC-Funktionen durch Genchip-Analysen.

Genchip-Analysen erlauben die Bestimmung der Expression einer großen Anzahl aktivierter bzw. reprimierter nachgeschalteter Gene in Folge der Expression eines zu untersuchenden Gens. In meinen Genchip-Analysen wurde der Affymetrix-Genchip U133A eingesetzt, der hauptsächlich DNA von Genen enthielt, die während der Differenzierung und Tumorgenese exprimiert werden. Das r-SREC-Gen selbst ist auf diesem Genchip nicht vorhanden. Die mRNA zur Hybridisierung wurde entweder aus stabil r-SREC-Protein exprimierenden KB-Zellen präpariert (als Kontrolle diente eine KB-Zelllinie die stabil mit dem Leervektor transfiziert war) oder aus T-REx-HeLa-Zellen isoliert, bei denen die Expression von r-SREC durch Gabe von Tetrazyklin erst induziert wurde. Hier dienten nicht induzierte T-REx-HeLa-Zellen als Kontrolle. Bei der Auswertung der Genchips wurden nur Gene berücksichtigt, die eine ausreichende Signalstärke („present“) aufwiesen und deren Genexpressionsänderung mindestens um den Faktor zwei, im Vergleich zur Kontrolle, erfolgt war.

Bei der Verwendung von mRNA aus r-SREC stabil exprimierenden KB-Zellen konnte bei 19 auf der auf dem Genchip aufgespotteten Gene eine Änderung der Genexpression festgestellt werden. Es ist ungewöhnlich, dass es sich bei der detektierten Genexpressionsänderungen in allen Fällen um eine Erhöhung der Genexpression handelte. Die Gruppe von Genen deren Expressionsänderung am ehesten mit Funktionen von r-SREC in Zusammenhang gebracht werden könnten, sind die PKC-assoziierten Gene. Diese sind das „Homo sapiens myristoylated alanin rich protein kinase C substrate“ und das „Homo sapiens ataxia-telangiectasia group D-associated Protein“, die als Substrate für die Protein Kinase C fungieren (Hartwig *et al.*, 1992; Laderoute *et al.*, 1996). Des weiteren wurde das in seiner Expression veränderte Gen Synuclein- α detektiert, dessen Überexpression die Aktivität der Protein Kinase C inhibiert (Ostrerova *et al.*, 1999).

Die Änderung des intrazellulären Calciumspiegels kann zur Aktivierung von Apoptose-Signalwegen führen (Abschnitt 5.4). In diesen Genchip-Analysen wurden auch die für die Proteine „Homo sapiens nuclear factor of activated T-Cells 5“ und Sorcin kodierenden

Gene in ihrer Expression erhöht detektiert, die mit der Regulation des Calciumspiegels in Verbindung gebracht werden können

In einer zweiten Genchip-Analyse wurde zur Hybridisierung mRNA von T-REx-HeLa-Zellen benutzt, bei denen die Expression des exogenen r-SREC-Gens zuvor induziert worden war. Hier wurde eine Änderung der Genexpression bei insgesamt neun Genen nachgewiesen, wobei nur Gene gefunden wurden, die in ihrer Expression reprimiert waren. Die höchste nachgewiesene Expressionsänderung wurde mit einer 8,51 fachen Repression der Expression des Gens „ribosomal Protein S13“ nachgewiesen. Da spekuliert wird, dass E1A-Funktionen an einer selektiven Repression der Translation zellulärer mRNAs an den Ribosomen zugunsten viraler mRNA beteiligt sind, könnte es sich auch bei diesem Gen um einen interessanten möglichen Kandidaten handeln.

Das „*Homo sapiens* lambdaiota protein kinase C interacting protein“ gehört zur Gruppe der atypischen Protein Kinasen C, die aufgrund einer fehlenden Calciumbindestelle nicht durch Calcium reguliert werden können (Diaz-Meco *et al.*, 1996).

Die detektierten Genexpressionen lassen vermuten, dass möglicherweise auch Protein Kinase C regulierte und an der Calcium-Homöostase beteiligte Gene mit der Funktion des r-SREC Gens in Zusammenhang gebracht werden können. Sowohl eine Änderung des Calciumspiegels, als auch Funktionen der Protein Kinase C können mit der Apoptose in Verbindung gebracht werden. Das RACK1-Protein, das wie das r-SREC-Protein einen zellulären Interaktionspartner der E1A-Proteine darstellt, gehört zur Familie der Rezeptoren für aktivierte Protein Kinase C und spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der Regulation und Funktion diverser PKC-Isoenzyme (Mochly-Rosen, 1995; Mochly-Rosen und Gordon, 1998; Mochly-Rosen und Kauvar 1998). Der genaue Mechanismus über den RACK1 die Lokalisationsänderungen hervorruft ist noch nicht bekannt.

Schwer zu verstehen ist, dass mit mRNA aus r-SREC exprimierenden KB-Zellen im Vergleich zu r-SREC nicht exprimierenden Zellen nur in ihrer Expression erhöhte Gene nachgewiesen wurden, während mit mRNA aus r-SREC exprimierenden T-REx-HeLa-Zellen nur in ihrer Expression reprimierte Gene gefunden wurden. Erstaunlich ist auch die relativ kleine Anzahl von Genen die in ihrer Expression verändert waren. Da in den Analysen kein Gen detektiert werden konnte, bei dem eine Änderung der Genexpression in beiden durchgeführten Chip Analysen nachgewiesen werden konnte, müssen diese Ergebnisse durch Realtime-RT-PCR-Experimente bestätigt werden.

Schließlich kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass trotz der Vielzahl von Genen, die der verwendete Affymetrix U133A Genchip enthält, die Gene nicht repräsentiert sind, deren Produkt mit dem r-SREC-Protein interagiert.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Adenovirale E1A-Proteine greifen in vielfältiger Weise in die Regulation zellulärer Prozesse ein. Daher ist es von großem Interesse die zellulären Interaktionspartner der E1A-Proteine zu identifizieren und in ihrer Struktur und Funktion zu charakterisieren. Ihre Analyse kann weitere Einblicke in die Mechanismen geben, mit denen adenovirale E1A-Proteine in zelluläre Prozesse wie z. B. der Zellzyklusregulation und der maligne Transformation eingreifen. Das Produkt des in unserer Arbeitsgruppe neu identifizierten r-SREC-Gens stellt einen neuen cytoplasmatisch lokalisierten Interaktionspartner der E1A-Proteine dar. Ziel dieser Arbeit war, die Interaktion des r-SREC-Protein mit E1A-Proteinen des Adenovirus Serotyps 12 genauer zu charakterisieren, seine genaue Lokalisation in der Zelle zu bestimmen und Hinweise auf mögliche Funktionen dieses Proteins zu erhalten.

- (1) Ich konnte erste Daten bestätigen, dass die aminoterminal gelegenen 79 Aminosäuren (N-Terminus plus CR1) und die konservierte Region 2 (CR2) für die Bindung des E1A-Proteins an das r-SREC-Protein essentiell sind. Eine genauere Bestimmung der r-SREC-Domänen, die von Seiten des r-SREC-Proteins an der Interaktion mit E1A beteiligt sind, gelang nicht.
- (2) Das r-SREC-Protein ist cytoplasmatisch und vermutlich am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Die Interaktion mit E1A führt zu keiner Veränderung der Lokalisation von r-SREC. Auch die Induktion von ER-Stress durch geeignete pharmakologische Agentien führte zu keiner Lokalisationsänderung des r-SREC-Proteins in der Zelle.
- (3) Durch TUNEL-Assays und AnnexinV/Propidiumiodid-Färbung konnte gezeigt werden, dass die Überexpression eines exogen eingeführten r-SREC-Gens zur Apoptose führt. Es zeigte sich außerdem, dass die Co-Expression des Ad12 E1A₁₃₅-Proteins die r-SREC induzierte Apoptose inhibiert. Dass die Hemmung des Apoptose wirklich auf Funktionen der E1A-Proteine zurück zu führen ist, muss durch Verwendung von Ad12 E1A₁₃₅-Proteinmutanten, die nicht mehr in der Lage sind mit dem r-SREC-Protein zu interagieren, bestätigt werden. In nachfolgenden Experimenten müsste auch die Frage geklärt werden in welchen Apoptoseweg das r-SREC Gen involviert ist.
- (4) Der Versuch mittels Hefe SOS-, „Two-Hybrid“-Systems unter der Verwendung einer Ratten-Hypophysen cDNA Bank einen zellulären Interaktionspartner des r-SREC-Gens zu identifizieren, war nicht erfolgreich. Auch erste Genchip-Analysen gaben keine eindeutigen Hinweise darauf, in welchen zellulären Signalweg das r-SREC-Protein involviert sein könnte.

7. Literaturverzeichnis

Aasland, R., Gibson, T. J. und Stewart, A. F. (1995): The PHD finger: Implications for chromatin mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 56-59.

Anbazzhagan, R., Fujii, H. und Gabrielson, E. (1988): Allelic loss of chromosomal arm 8p in breast cancer progression. *Am. J. Pathol* **152**: 815-819.

Anderson, S., Davis, D. L., Dahlbäch, H., Jörnvall, H., und Russel, D. W. (1989): Cloning structure and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J. Biol. Chem.* **264**, 8222-8229.

Angel, P. und Karin, M. (1991): The role of Jun, Fos and AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochem. Biophys. Acta* **1072**: 129-157.

Aronheim, A., Engelberg, D., Li, N., Al-Alawi, N., Schlesinger, J. und Karin, M. (1994): Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. *Cell* **78**: 949-961.

Aronheim, A., Zandi, E., Hennemann, H., Elledge, S. und Karin, M. (1997): Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 3094-3102.

Aronheim, A. (1999): Improved efficiency Sos recruitment system: expression of the mammalian GAP reduces isolation of Ras GTPase false positives. *Nucleic Acids Research* **25** (16): 3373-3374.

Aronheim, A. (2000): Protein recruitment systems for the analysis of protein-protein interactions. *Biochemical Pharmacology* **60**: 1009-1013.

Aronheim, A. (2001): Protein recruitment systems for the analysis of protein-protein interactions. *Methods* **24**: 29-34.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R., et al., eds. (1997): Current protocols in molecular biology. New York: Wiley.

Avantaggiati, M. L., Okryzko, V. V., Gardner, K., Giordano, A., Levine, A. S. und Kelly, K. (1997): Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* **89**: 1175-1184.

Bailey, A. und Mautner, V. (1994): Phylogenetic relationships among adenovirus serotypes. *Virology* **205**: 438-452.

- Bartels, D. J., Mitchell, D. A., Dong, X. und Deschenes R. J. (1999):** Erf2, a novel gene product that affects the localisation and palmitoylation of Ras2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **19** (10): 6775-6787.
- Bayley, S. T. und Mymryk, J. S. (1994):** Adenovirus E1A proteins and transformation. *Int. J. Oncol.* **5**: 425-444.
- Bernards, R., Schrier, P. I., Houweling, A., Bos, J. L., van der Eb, A. J., Zylstra, M. und Melief, C. J. M. (1983):** Tumorigenicity of cells transformed by adenovirus type 12 by evasion of T-cell immunity. *Nature* **305**: 776-797.
- Bohm, S., Frishmann, D., Mewes, H. W. (1997):** Variations of the C2H2 zinc finger motif in the yeast genome and classification of yeast zinc finger proteins. *NAR* **25**: 2464-2469.
- Bova, G. S., Carter, B. S., Bussemakers, M. J. G., Emi, M., Fujiwara, Y., Kyprianou, N., Jacobs, S. C., Robinson, J. C., Epstein, J. I., Walsh, P. C. und Isaacs, W. B. (1993):** Homozygous deletion and frequent allelic loss of chromosom 8p22 loci in human prostate cancer. *Cancer Research* **53**: 3869-3873.
- Boyer, T. G., Martin, M. E., Lees, E., Ricciardi, R. P. und Berk, A. J. (1999):** Mammalian Srb/Mediator complex is targeted by adenovirus E1A protein. *Nature* **399**: 276-279.
- Bradford, M. M. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Breckenridge, D. G., Germain, M., Mathai, J. P., Nguyen, M. und Shore, G C. (2003):** Regulation of apoptosis by endoplasmatic reticulum pathways. *Oncogene* **22**: 8608-8618.
- Brockmann, D., Tries, B. und Esche, H. (1990):** Isolation and characterisation of novel adenovirus type 12 E1A mRNAs by cDNA cloning. *Virology* **179**: 585-590.
- Brockmann, D. und Esche, H. (1995):** Regulation of viral and cellular gene expression by E1A proteins encoded by the oncogenic adenovirus type 12. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199**: 81-112.
- Brockmann, D., Fax, P., Hashemi, R., Kullmann, S., Lehmkuhler, O., Nolte, C. und Esche, H. (2001):** Adenovirus E1A: a functional link between transcription factors and co-activators. *Recent Res. Devel. Virol.* **3**: 277-295.
- Broder, Y. C, Katz, S. und Aronheim A. (1998):** The Ras-Recruitment System, a novel approach to the study of protein-protein interactions. *Curr. Biol.* **8**: 1121-1124.

- Broker, T. R., Keller, C. C. und Roberts, R. J. (1984):** Human adenovirus serotypes 2, 4, 8, 40 and 41 and adenovirus-simian virus 40 hybrids. In: *Genetic maps*, Vol. 3 (O' Brian, S. J., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 99-110.
- Burgert, H. G., Maryanaska, J. L. und Kvist, S. (1987):** „E3/19K“ protein of adenovirus type 2 inhibits lysis of cytotoxic T lymphocytes by blocking cell-surface expression of histocompatibility class I antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 1356-1360.
- Byrd, P. J., Grand, R. J. und Gallimore, P. H. (1988):** Differential transformation of primary human embryo retinal cells by adenovirus E1 regions and combinations of E1A + ras. *Oncogene* **2**: 477-484.
- Chaudhary, J. und Skinner, M. K. (2002):** Identification of a novel gene product, sertoli cell gene with a zinc finger domain, that is important for FSH activation of testicular sertoli cells. *Endocrinology* **143** (2): 426-435.
- Cohen, C. J., Shieh, J. T. C., Pickles, R. J., Okegawa, T., Hsieh, J. T. und Bergelson, J. M. (2001):** The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 15191-15196.
- Colicelli, J., Birchmeier, C., Michaeli, T., O'Neill, K., Riggs, M. und Wigler, M. (1989):** Isolation and characterization of a mammalian gene encoding a high-affinity cAMP phosphodiesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3599-3603.
- Cong F., und Goff, S. P. (1999):** c-Abl-induced apoptosis, but not cell cycle arrest, requires mitogen-activated protein kinase kinase 6 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (24): 13819-13824.
- Cook, J. L., May, D. L., Lewis, A. M. J. und Walker, T. A. (1987):** Adenovirus E1A gene induction of susceptibility to lysis by natural killer cells and activated macrophages in infected rodent cells. *J. Virol.* **61**: 3510-3520.
- Cullan, B. R. (2001):** Journey to the center of the cell. *Cell* **105**: 697-700.
- David, I. B., Toyama, R. und Taira, M. (1995):** LIM domain proteins. *CR. Acad. Sci. Paris* **318**: 295-306.
- Debbas, M. und White, E. (1993):** Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A which is inhibited by E1B. *Genes Dev.* **7**: 546-554.
- Deng, J., Xia, W., und Hung, M. (1998):** E1A-mediated tumor suppression associated with E1A-mediated apoptosis *in vivo*. *Oncogene* **17**: 2167-2175.

- Diaz-Meco, M. T., Municio, M. M., Sanchez, P., Lozano, J. und Moscat, J. (1996):** Lambda-Interacting protein, a novel protein that specifically interacts with the zinc finger domain of the atypical protein kinase c isotype $\lambda\iota$ and stimulates its kinase activity *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **16** (1): 105-114.
- Doerfler, W. (1969):** Nonproductive infection of baby hamster kidney cells (BHK21) with adenovirus type 12. *Virology* **38**: 587-606.
- Emi, M., Fujiwara, Y., Ohata, H., Tsuda, H., Hirohashi, S., Koike, M., Miyaki, M., Monden, M. und Nakamura, Y. (1993):** Allelic loss at chromosome band 8p21.3-p22 is associated with progression of hepatocellular carcinoma. *Genes Chromosomes & Cancer* **7**: 152-157.
- Esche, H., Schilling, R. und Doerfler, W. (1979):** *In vitro* translation of adenovirus type 12-specific mRNA isolated from infected and transformed cells. *J. Virol.* **30**: 21-31.
- Esche, H. und Siegmann, B. (1982):** Expression of early viral gene products in adenovirus type 12 infected and transformed cells. *J. Virol.* **60**: 99-113.
- Fax, P., Carlson, C. R., Collas, P., Tasken, K., Esche, H. und Brockmann, D. (2001):** Biding of PKA-RII α to the adenovirus E1A_{12S} oncoprotein correlates with its nuclear translocation and increase in PKA-dependent promoter activity. *Virology* **285**: 30-41.
- Ferguson, B., Kripple, B., Andrisani, O., Jones, N., Westphal, H., und Rosenberg, M. (1985):** E1A_{13S} and 12S mRNA products made in Eschericia coli both function as nucleus-localized transcription activators but do not directly bind DNA. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 2653-2661.
- Flint, J. und Broker, T. R. (1981):** Lytic infection by adenoviruses. In: *Molecular Biology of Tumor Viruses* (Tooze, J., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 443-547.
- Friedmann, D. J. und Ricciardi, R. P. (1988):** Adenovirus type 12 E1A gene represses accumulation of MHC Class I mRNA at the level of transcription. *Virology* **165**: 303-305.
- Fuchs, M., Gerber, J., Drapkin, R., Sif, S., Ikura, T., Ogryzko, V., Lane, W. S., Nakatani, Y. und Livingston, D. M. (2001):** The p400 complex is an essential E1A transformation target. *Cell* **106**: 297-307.
- Fuyiwara, Y., Emi, M., Ohata, H., Kato, Y., Nakajima, T., Mori, T. und Nakamura Y. (1993):** Evidence for the presence of two tumor suppressor genes on chromosome 8p for colorectal cancer. *Cancer Research* **53**: 1172-1174.
- Fujiwara, Y., Ohata, H., Emi, M., Koyama, K., Tsuchiva, E., Nakajima, T., Monden, M., Mori, T., Kurimasa, A., Oshimura, M. und Nakamura, Y. (1994):** A 3-Mb physical map of the chromosome region 8p21.3-p22, including a 600-kb region commonly deleted in

human hepatocellular carcinoma, colorectal cancer, and non-small lung cancer. *Genes Chromosomes & Cancer* **10**: 7-14.

Gabler, S., Schütt, H., Groitl, P., Wolf, H., Shenk, T. und Dobner, T. (1998): E1B 55-kilodalton-associated protein: a cellular protein with RNA-binding activity implicated in nucleocytoplasmic transport of adenovirus and cellular mRNAs. *J. Virol.* **72**: 7960-7971.

Gallimore, P. H. und Turnell, A. S. (2001): Adenovirus E1A: remodelling the host cell, a life or death experience. *Oncogene* **20**: 7824-7835.

Gey, G., Coffman, W., und Kubicek, M. T. (1952): Tissue culture studies of the proliferative capacity of the cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**: 264-265.

Gooding, L. R., Elmore, L. F., Tollefson, A. E., Brody, H. A. und Wold, W. S. M. (1988): A 14,700 MW protein from the E3 region of adenovirus inhibits cytolysis by tumor necrosis factor. *Cell* **53**: 341-346.

Gooding, L. R., Aquino, L., Duerksen-Huges, P. J., Day, D., Horton, T. M., Yei, S. P. und Wold, W. S. (1991): The E1B 19,000-molecular-weight protein of group C adenoviruses prevents tumor necrosis factor cytolysis of human cells but not of mouse cells. *J. Virol.* **65**: 3080-3094.

Grand R. J. A, Schmeiser, K., Gordon, E. M., Zhang, X., Gallimore, P. H., Turnell, A. S. (2002): Caspase-mediated cleavage of adenovirus early region 1A Proteins. *Virology* **301**: 255-271.

Greber, U. F., Willetts, M., Webster, P. und Helenius, A. (1993): Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* **75**: 477-486.

Greber, U. F., Suomalainen, M., Stidwill, R. P., Boucke, K., Ebersold, M. W. und Helenius, A. (1997): The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *EMBO J.* **16**: 5998-6007.

Grossman, S. R., Perez, M., Kung, A. L., Joseph, M., Mansur, C., Xiao, Z. X., Kumar, S., Howley, P. M. und Livingston, D. M. (1998): P300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation. *Mol. Cell* **2**: 405-415.

Han, J., Sabbatini P., Perez, D., Rao, L., Modha, D. und White, E. (1996): The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes Dev.* **10**: 461-477.

Hancock, J. F., Magee, A. I., Childs, J. und Marshall, C. J. (1989): All ras proteins are polyisoprenylated but some are palmitoylated. *Cell* **57**: 1167-1177.

Harlow, E. und Lane, D. (1988): In: *Antibodies, A Laboratory Manual*. CSH Laboratory Press, CSH, New York, USA.

Hillen, W. und Berens, C. (1994): Mechanism underlying expression of Tn10 encoded tetracycline Resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 345-369.

Hillen, W., Gatz, C., Altschmied, L., Schollmeier, K. und Meier, I. (1983): Control of expression of the Tn10-encoded tetracycline resistance genes: equilibrium and kinetic investigations of the regulatory reactions. *J. Mol. Biol.* **169**, 707-721.

Horwitz, M. S., Scharff, M. D. und Maizel, J. V. (1969): Synthesis and assembly of adenovirus 2. I. Polypeptide synthesis, assembly of capsomeres and morphogenesis of the virion. *Virology* **39**: 682-684.

Horwitz, M. S. (1990): Adenovirus. In: *Virology* (Fields, B. N. und Knipe, D. M., eds.), Raven Press, New York, pp. 1723-1740.

Houweling, A., van den Elsen, P. J. und van der Eb, A. J. (1980): Partial transformation of primary rat cells by the leftmost 4,5 fragment of adenovirus 5 DNA. *Virology* **105**: 537-550.

Huang, W., Wang, S-L., Lozano, G., de Crombrughe, B. (2001): cDNA library screening using SOS recruitment system. *BioTechniques* **30**: 94-100.

Huvent, I., Cousin, C., Kiss, A., Baroni de Moraes, M. T., Bernard, C. und D'Halluin, J. C. (1997): Downregulation of major histocompatibility complex class I expression and susceptibility to natural killer cells in cells transformed with the oncogenic adenovirus 12 are regulated by different E1A domains. *Cancer Detect. Prev.* **21**: 12-21.

Ichii, S., Takeda, S., Horii, A., Nakatsuru, S., Miyoshi, Y., Emi, M., Fujiwara, Y., Koyama, K., Furuyama, J., Utsunomiya, J., Nakamura, Y., (1993): Detailed analysis of genetic alterations in colorectal tumors from patients with and without familial adenomatous polyposis (FAP). *Oncogene* **8**: 2399-2405.

Ikeda, M. A. und Nevins, J. R. (1993): Identification of distinct roles for separate E1A domains in disruption of E2F complexes. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 7029-7035.

Ito, Y., Pandey, P., Mishra, N., Kumar, S., Narula, N., Kharbanda, S., Saxena, S., Kufe, D. (2001): Targeting of the c-Abl tyrosine kinase to mitochondria in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 6233-6242.

Jelinek, T., Pereira, D. S. und Graham, F. L. (1994): Tumorigenicity of adenovirus-transformed rodent cells is influenced by at least two regions of adenovirus early region 1A. *J. Virol.* **68**: 888-896.

- Jochemsen, H., Daniels, G. S. G., Hertoghs, J. J. L., Schrier, P. I., van den Elsen, P. J. und van der Eb, A. J. (1982):** Identification of adenovirus-type 12 gene products involved in transformation and oncogenesis. *Virology* **122**: 15-28.
- Jones, N. (1995):** Transcriptional modulation by the adenovirus E1A gene *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199**: 59-80.
- Kimelmann, D., Miller, J., Porter, D. und Roberts, B. (1985):** E1A regions of human adenoviruses and the highly oncogenic simian virus 7 are closely related. *J. Virol.* **53**: 399-409.
- Klebe, R. J., Harriss, Z., Sharo, D., Douglas, M. G. (1983):** A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene* **25**: 333-341.
- Klug, A. (1995):** Gene regulatory proteins and their interaction with DNA. *Ann NY Acad Sci* **758**: 143-160.
- Knösel, T., Petersen, S., Schwabe, H., Schlüns, K., Stein, U., Schlag, P. M., Dietel, M., und Peterson, I. (2002):** Incidence of the chromosomal imbalances in advanced colorectal carcinoma and their metastases. *Virchows Arch.* **440**: 187-194.
- Kolli, S., Buchmann, A. M., Williams, J., Weitzmann, S. und Thimmapaya, B. (2001):** Antisense-mediated depletion of p300 in human cells leads to premature G1 exit and up-regulation of c-Myc. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 4646-4651.
- Laemmli, U. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laderoute, K. R., Knapp, A. M., Green, C. J., Sutherland, R. M. und Kapp, L. N. (1996):** Expression of the ATDC (ataxia telangiectasia group D complementing) gene in A431 human squamous carcinoma cells. *Int. J. Cancer* **66 (6)**: 7728-7734.
- Lewis, J. M., Baskaran, R. F., Taagepera, S., Schwartz, M. A., und Wang, J., Y. (1996):** Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93 (26)**: 15174-9. 15174-15179.
- Li, B., Cong, F., Ping Tan, C., Wang, S. X. und Goff, S. P. (2002):** Aph2 a protein with zf-DHHC motif, interacts with c-ABL and has pro apoptotic activity. *J. Biol. Chem.* **277 (32)**: 28870-28876.
- Lill, N., Grossmann, S. R., Ginsberg, D., DeCaprio, J. und Livingston, D. M. (1997):** Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* **387**: 823-827.

Lindner, M. E. und Deschenes, R. J. (2004): Model organisms lead the way to palmitoyltransferases. *J. Cell Science* **117 (Pt 4)**: 521-526

Lipinski, K. S., Fax, P., Wilker, B., Hennemann, H., Brockmann, D. und Esche, H. (1999): Differences in the interactions of oncogenic adenovirus 12 early region 1A and nononcogenic adenovirus 2 early region 1A with the cellular coactivators p300 and CBP. *Virology* **255**: 94-105.

Liu, F. und Green, M. R. (1990): A specific member of the ATF transcription factor family can mediate transcription activation by the adenovirus E1A Protein. *Cell* **61**: 1217-1224.

Lobo, S., Greentree, W. K., Lindner, M. E., Deschenes, R. J (2002): Identification of a Ras palmitoyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277 (43)**: 21268-73.

Lovering, R., Hanson, I. M., Borden, K. L. B., Martin, S., O'Reilly, N. J., Evan, G. I., Rahman, D., Pappin, D. J. C., Trowsdale, J., Freemont, P. S. (1993): Identification and preliminary characterisation of a protein motif related to the zinc finger. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 2112-2116.

Madison D. L., Yaciuk, P., Kwok, R. P. S. und Lundblad, J. R. (2002): Acetylation of the Adenovirus-transforming protein E1A determines nuclear localisation by disrupting association with importin- α . *J. Biol. Chem.* **11**: 38755-38763.

Magee, T. und Marshall, C. (1999): New insights into the interaction of Ras with the plasma membrane. *Cell* **98**: 9-12.

Martegani, E., Vanoni, M., Zippel, R., Coccheti, P., Brambilla, R., Ferrari, C., Sturani, E. und Alberghina, L. (1992): Cloning by functional complementation of a mouse cDNA encoding homolog of CDC25, a *Saccharomyces cerevisiae* RAS activator. *EMBO J.* **11**:2151-2157.

Mesilaty-Gross, S., Reich, A., Motro, B. und Wides, R. (1999): The *Drosophila* STAM gene homolog is in a tight gene cluster, and its expression correlates to that of adjacent gene *ial*. *Gene* **231**: 173-186.

Mochley-Rosen, D. (1995): Localisation of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* **268**: 247-251.

Mochley-Rosen, D. and Gordon, A. S. (1998): Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB J.* **12**: 35-42.

Mochley-Rosen, D. und Kauvar, L. M. (1998): Modulating protein kinase C signal transduction. *Adv Pharmacol* **44**: 91-145.

- Moran, E. (1994):** Mammalian cell growth controls reflected through protein interactions with the adenovirus E1A gene products. *Semin. Virol.* **5**: 327-340.
- Morgenstern, J. P. und Land, H. (1990):** Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res.* 1990 **18 (12)**:3587-96.
- Mullis, K., Falcoona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Ehrlich, H. (1986):** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Quant. Biol.* **51**: 263-273.
- Mymryk, J. S. und Smith, M. M. (1997):** Influence of the adenovirus 5 E1A oncogene on chromatin remodelling. *Biochem. Cell. Biol.* **75**: 95-102.
- Nakagawa, T., Yuan, J. (2000):** Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J. Cell. Biol.* **150**: 887-894.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner und B. A., Yuan, J. (2000):** Caspase-12 mediated endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature* **403**: 98-103.
- Nelson J. A., Reynolds-Kohler, C., und Smith, B. A.(1987):** Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 4125-4129.
- Nevels, M., Täuber, B., Spruss, T., Wolf, H. und Dobner, T. (2001):** „Hit and run“ transformation by adenovirus oncogenes. *J. Virol.* **75**: 3089-3094.
- Nevins, J. R. und Vogt, P. K. (1996):** Cell transformation by viruses. In: *Fundamental Virology* (Fields, B. N., Knipe, D.M., Howley, P.M. *et al.*, eds.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 267-309.
- Norrby, E., Bartha, A. und Boulanger, P. (1976):** Adenoviridae. *Intervirology* **7**: 117-125.
- Ohata, H., Emi, M., Fujiwara, Y., Higashino, K., Nakagawa, K., Futagami, R., Tsuchiya, E. und Nakamura, Y. (1993):** Deletion mapping of the short arm of chromosome 8 in non-small lung cancer. *Genes Chromosomes & Cancer* **7**: 85-88.
- Omichinski, J. G., Clore, G. M., Schaad, O., Felsenfeld, G., Trainor, C., Appella, E., Stahl, S. J. und Gronenborn A. M. (1993):** NMR structure of specific DNA complex on Zn-containing DNA binding domain of GATA-1. *Science* **261**: 438-446.
- Osterova, N., Petrucelli, L., Farrer, M., Metha, N., Choi, P., Hardy, J., und Wolozin, B. (1999):** Alpha-Synuclein shares physical homology with the 14-3-3 proteins. *J. Neurosci.* **19 (14)**: 5782-91.

- Oyama, T., Miyoshi, Y., Koyama, K., Nakagawa, H., Yamori, T., Ito, T., Matsuda, H., Arakawa, H. und Nakamura, Y. (2000):** Isolation of a novel gene on 8p21.3-22 whose expression is reduced significantly in human colorectal cancers with liver metastases. *Genes, Chromosomes & Cancer* **29**: 9-15.
- Pan T. und Coleman J. E. (1991):** Sequential assignments of the ^1H NMR resonances of Zn(II)_2 and $^{133}\text{Cd(II)}_2$ derivatives of the DNA-binding domain of the GAL4 transcription factor reveal a novel structural motif for specific DNA recognition. *Biochemistry* **30**: 4212-4222.
- Pastan, I., Seth, P., Fitzgerald, D. und Willingham, M. (1987):** Adenovirus entry into cells: some new observations on an old problem. In: *Concepts in viral pathogenesis* (Notkins, A. und Oldstone M. B. A., eds.) Springer Verlag, New York, pp. 141-146.
- Pavletich, N.P. und Pabo, C. O. (1991):** Zinc-finger-DNA recognition: Crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* **252**: 809-817.
- Pereira, D. S., Jelinek, T., und Graham, F. L. (1994):** The adenovirus E1A-associated p300 protein is differentially phosphorylated in Ad12 E1A- compared to Ad5 E1A-transformed rat cells. *Int. J. Oncol.* **5** : 1197-1205.
- Perricaudet, M., Le Moullec, J., Toillais, P. und Petterson, U. (1980):** Structure of two adenovirus type 12 transforming polypeptides and their evolutionary implications. *Nature* **288**: 174-176.
- Petijean, A., Hilger, F., Tachell, K. (1990):** Comparison of thermosensitive alleles of the CDC25 gene involved in the cAMP metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **124**: 797-806.
- Philipson, L. (1983):** Structure and assembly of adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **109**: 1-53.
- Pilder, S., Moore, M., Logan, J. und Shenk, T. (1986):** The adenovirus E1B-55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmic stabilisation of viral and host cell mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 470-476.
- Puttilina, T., Wong, P. und Gentleman, S. (1999):** The DHHC domain: a new highly conserved cysteine rich motif. *Mol. Cell. Biochem.* **195**:219-226.
- Postle, K., Nguyen, T. T. und Bertrand, K. P. (1984):** Nucleotide sequence of the repressor gene of the Tn10 tetracycline resistance determinant. *Nuc. Acids Res.* **12**: 4849-4863.
- Quin, L.-X., Tang, Z.-Y., Ye, S.-L., Liu, Y.-K., Ma, Z.-C., Zhou, X.-D., Wu, Z.-Q., Lin, Z.-Y., Sun, F.-X., Tian, J., Guan, X.-Y., Pack, S.D. und Zhuang, Z.-P. (2001):** Chromosome 8p deletion is associated with metastases of human hepatocellular carcinoma

when high and low metastatic models are compared. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **127**: 482-488.

Quilliam, L. A., Huff, S. Y., Rabun, K. M., Wei, W., Park, W., Broek, D. und Der, C. J. (1994): Membrane targeting potentiates guanine nucleotide exchange factor CDC25 and SOS1 activation of Ras transforming activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 8512-8516.

Rao, L., Debbas, M., Sabbatini, P., Hockenbery, D., Kosmeyer, S., und 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. USA* **89**: 7742-7746.

Roelvink, P. W., Lizonova, A., Lee, J. G. M., Li, Y., Bergelson, J. M., Finberg, R. W., Brough, D. E., Kovesdi, I. und Wickham, T. J. (1998): The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J. Virol.* **72**: 7909-7915.

Rotem-Yehudar, R., Groettrup, M., Soza, A., Kloetzel, P. M. und Ehrlich, R. (1996): LMP-associated proteolytic activities and TAP-dependent peptide transport for class I MHC-molecules are suppressed in cell lines transformed by the highly oncogenic adenovirus 12. *J. Exp. Med.* **183**: 499-514.

Roth, A. F., Feng, Y., Chen, L. und Davis, N.G. (2002): The yeast DHHC cystein-rich domain protein Akr1p is a palmitoyl transferase. *J. Cell Biology* Vol **159** Nr **1**: 1-6.

Rowe, W. P., Heubner, R. J., Gallimore, L. K., Parrot, R. H. und Ward, T. G. (1953): Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* **84**: 570-573.

Ruley, H.E. (1983): Adenovirus early region 1 A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* **304**: 602-606.

Russel, W. E. (2000): Update on adenovirus and its vectors. *J. General Virol.* **81**: 2573-2604.

Sabbatini, P., Chiou, S. K., Rao, L. und White E. (1995): Modulation of p53-mediated transcriptional repression and apoptosis by the adenovirus E1B 19K protein. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 1060-1070.

Saha, V., Chapin, T., Gregorini, A., Ayton P. und Young, B. D. (1995): The leukemia-associated-protein (LAP) domain, a cysteine-rich motif, is present in a wide range of proteins, including MLL, AF10, and MLLT6 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9737-9741.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual, second edition. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.*

- Sanchez-Garcia, I. und Rabbitts, T. H. (1994):** The LIM domain: A new structural motif found in zinc-finger-like proteins. *Trends Genet* **10**: 315-320.
- Sang, N., Severino, A., Russo, P., Baldi, A., Giordano, A., Mileo, A. M., Paggi, M. G. und De Luca, A. (2001):** RACK1 interacts with E1A and rescues E1A-induced yeast growth inhibition and mammalian cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* **29**: 27026-27033.
- Sarnow, P., Ho, Y., Williams, J. und Levine, A. J. (1982):** Adenovirus E1B-58K tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54K cellular protein in transformed cells. *Cell* **28**: 387-394.
- Saurin A. J., Borden K. L. B., Boddy N. M. und Freemont P. S. (1996):** Does this have a familiar RING? *Trends Biochem Sci* **21**: 208-214.
- Sawada, Y. und Fujinaga, K. (1980):** Mapping of adenovirus type 12 mRNAs transcribed from the transforming region. *J. Virol.* **36**: 639-651.
- Schiestl R. H., Gietz, R. D. (1989):** High efficiency transformation of intact yeast cells using single strands nucleic acids as carrier. *Curr. Genet.* **16**: 339-346.
- Schmeichel K. L. und Beckerle M. C. (1994):** The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell* **79**: 211-219.
- Schouten, G. J., van der Eb, A. J. und Zantema, A. (1995):** Downregulation of MHC Class I expression due to interference with p105-NF-kappa B1 processing by Ad12E1A. *EMBO J.* **14**: 1498-1507.
- Schulz, W. A., Elo, J. P., Florl, A. R., Pennanen, S., Santourlidis, S., Engers, R., Buchardt, M., Seifert, H.-H. und Visakorpi, T. (2002):** Genomewide DNA hypomethylation is associated with alterations on chromosome 8 in prostate carcinoma. *Genes Chr. & Cancer* **35**: 58-65.
- Shenk, T. (1996):** Adenoviridae: the viruses and their replication. In: *Fundamental Virology*, Third Edition, (Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. *et al.*, eds.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA.
- Shinohara, M., Hiraki, A., Ikebe, T., Nakamura, S., Kurahara, S.-I., Shirasuna, K. und Garrod, D. R. (1998):** Immunohistochemical study of desmosomes in oral squamous cell carcinoma: correlation with cytokeratin and E-cadherin staining, and with tumour behaviour. *J. Path.* **184**: 369-381.
- Shirayoshi, Y., Miyazaki, J., Burke, P. A., Hamada, K., Apella, E. und Ozato, K. (1987):** Binding of multiple nuclear factors to the 5' upstream regulatory element of the murine major histocompatibility complex class I gene. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 4542-4548.

Slansky, J. E. und Farnham, P. J. (1996): Introduction to the E2F family: Protein structure and gene regulation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **208**: 13-30.

Smirnov, D. A., Hou, S., Liu, X., Claudio, E., Siebenlist, U. K. und Ricciardi, R. P. (2001): COUP-TFII is up-regulated in adenovirus type 12 tumorigenic cells and is a repressor of MHC class I transcription. *Virology* **284**: 13-19.

Smits, P. H. M., de Wit, L., van der Eb, A. J. und Zantema, A. (1996): The adenovirus E1A-associated 300 kDa adaptor protein counteracts the inhibition of the collagenase promoter by E1A and represses transformation. *Oncogene* **12**: 1529-1535.

Southern, E. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.

Sparer, T. E. und Gooding, L. R. (1998): Suppression of MHC class I antigen presentation by human adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **232**: 135-147.

Stephens, C. und Harlow, E. (1987): Differential splicing yields novel adenovirus 5 E1A mRNA that encode 30 kd and 35 kd proteins. *EMBO J.* **6**: 2027-2035.

Stewart, P. L., Fuller, S. D., und Burnett, R. M. (1993): Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallographie and electron microscopy. *EMBO J.* **12**: 2589-2599.

Strober, B. E., Dunaief, J. L., Guha, S. und Goff, S. P. (1996): Functional interactions between the hBRM/hBRG1 transcriptional activators and the pRB family of proteins. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 1576-1583.

Sundararajan, R. und White, E. (2001): E1B 19K blocks bax oligomerisation and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis. *J. Virol.* **75**: 7506-7516.

Sussenbach, J. S. und van der Vliet, P. C. (1983): The mechanism of adenovirus DNA replication and the characterization of replication proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **109**: 53-75.

Teodoro, J. G., Shore, G. C., und Brandton, P. E. (1995): Adenovirus E1A proteins induce apoptosis by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene* **11**: 467-474.

Telling, G. C. und Williams, J. (1994): Constructing chimeric type 12/type5 adenovirus E1A genes and using them to identify an oncogenic determinant of adenovirus type 12. *J. Virol.* **68**: 877-887.

Theis S., und Roemer K (1998): c-Abl tyrosine kinase can mediate tumor cell apoptosis independently of the Rb and p53 tumor suppressors. *Oncogene* **17** (5):557-564.

Thomas, A. und White, E. (1998): Suppression of the p300-dependent mdm2 negative feedback loop induces the p53 apoptotic function. *Genes Dev.* **12**: 1975-1985.

Tollefson, A. E., Ryerse, J. S., Scaria, A., Hermiston, T. W. und Wold, W. S. M. (1996): The E3-11,6-kDa adenovirus death protein is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. *Virology* **200**: 152-162.

Tooze, J. (1981): Molecular biology of tumor viruses - part 2, DNA tumor viruses. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.

Trotman, L. C., Mosberger, N., Fornerod, M., Stidwill, R. P. und Greber, U. F. (2001): Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. *Nat. Cell. Biol.* **3**: 1092-1100.

Tsuruo, T., Yamori, T., Naganuma, K., Tsukagoshi, S. und Sakurai, Y. (1983): Charakterisation of metastatic clones derived from metastatic variant of mouse colon adenocarcinoma 26. *Cancer Research* **43**: 5437-5442.

Turnell, A. S., Grand, R. J. A., Gorbea, C., Zhang, X., Wang, W., Mymryk, J. S. und Gallimore, P. H. (2000): Regulation of the proteasome by adenovirus E1A. *EMBO J.* **19**: 4759-4773.

Uemura, T., Mori, H. und Mishina, M. (2002): Isolation and charakterisation of golgi apparatus-specific GODZ with the DHHC zinc finger domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **296**: 492-496.

Ulfendahl, P. J., Linder, S., Kreivi, J.-P., Nordquist, K., Svensson, C., Hultberg, H. und Akusjärvi, G. (1987): A novel adenovirus 2 E1A mRNA encoding a protein with transcription activation properties. *EMBO J.* **6**: 2037-2044.

van den Elsen, P. J., Houweling, A. und van der Eb, A. J. (1983): Morphological transformation of human adenovirus is determined to a large extent by gene products of region E1A. *Virology* **131**: 242-246.

van der Eb, A. J., Mulder, C., Graham, F. L. und Houweling, A. (1977): Transformation with specific fragments with transforming activity of adenovirus 2 and 5 DNA. *Gene* **2**: 115-132.

van der Eb, A. J. und Bernards, R. (1984): Transformation and oncogenicity by adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **110**: 23-51.

Van Etten, R. A. (1999): . Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol* **9(5)**:179-186.

Vermes, I., Haanen, C., Steffen-Nakel, H. und Reutelingsperger C.(1995): A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression in early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Meth.* **184 (1)**: 39-51.

Vigneri, P., und Wang, J. Y.(2001): Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. *Nat. Med.* **7(2)**:228-234.

Wadell, G. (1984): Molecular epidemiology of adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **110**: 191-220.

Wang, H. G. H., Yaciuk, P., Ricciardi, R. P., Green, M., Yokoyama, K. und Moran, E. (1993): The E1A products of oncogenic adenovirus serotype 12 include an amino-terminally modified form able to bind the retinoblastoma protein but not p300. *J. Virol.* **67**: 4804-4813.

West, R. W., Chen, S., Putz, H., Butler, G.und Banerjee, M. (1987): GAL1-GAL-10 divergent promotor region of *Saccharomyces cerevisiae* contains negative control elements in addition to finctionally separate ans possibly overlapping upstream activating sequences. *Genes Dev.* **1**: 1118-1131.

White, E., Sabbatini, P., Debbas, M., Wold, W. S. M., Kushner, D. I. und Gooding, L. (1992): The 19-kilodalton adenovirus E1B transforming protein inhibits programmed cell death and prevents cytolysis by tumor necrosis factor alpha. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 2570-2580.

White, E. (1995): Regulation of p53-dependent apoptosis by E1A and E1B. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199/III**: 33-59.

Whittaker, J. L., Byrd, P.J., Grand, R. J. und Gallimore P. H. (1984): Isolation and characterisation of four adenovirus type 12-transformed human embryo kidney cell lines. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 110-116.

Whyte, P., Buchkovich, K. J., Horowitz, J. M., Friend, S. H., Raybuck, M., Weinberg, R. A. und Harlow, E. (1988): Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* **334**: 124-129.

Williams, J., Williams, M., Liu, C. und 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/III**: 149-177.

Yamori, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. und Tsuruo, T. (1988): Growth stimulating activity of lung extract on lung colonizing colon 26 clones and its partial characterisation. *Clin. Exp. Metastasis* **6**: 131-139.

Yao, F., Svensjö, T., Winkler, T., Lu, M., Eriksson, C., und Eriksson, E. (1998): Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum. Gene Ther.* **9**, 1939-1950.

Yaremko, M. L., Kutza, C., Lyzak, J., Mick, R., Recant, W. M. und Westbrook, C. A. (1996): Loss of heterozygosity from the short arm of chromosome 8 is associated with invasive behavior in breast cancer. *Genes Chromosomes & Cancer* **16**: 189-195.

Zaho, L., Lobo, S., Dong, X., Ault, A. D. und Deschenes R. J. (2002): Erf4p and Erf2p form an endoplasmatic reticulum associated complex involved in the plasma membrane localization of yeast Ras proteins. *J. Biol. Chem.* **Vol. 277 No. 51**: 49352-49359.

Zhang, H. S., Mak, S. und Branton, P. E. (1995): Adenovirus type 12 early region 1 B proteins and metabolism of viral mRNAs. *Virology* **191**: 793-802.

Zhang, H. S., und Dean, D. C. (2001): Rb-mediated structure regulation and transcriptional repression. *Oncogene* **20**: 3134-3138.

8. Publikationen

Schoppmeyer, K., Kullmann, S., Brockmann, D. und Esche, H. (2003): R-SREC: a putative tumor suppressor gen interacting with E1A. *Posterpräsentation, ICGEB DNA TUMOR VIRUS MEETING*

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Katja-Patrica Schoppmeyer
Geburtsdatum: 06.07.76
Geburtsort: Paderborn
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch
Anschrift: Hellweg 47, 45276 Essen

Hochschulausbildung

ab Jan 2001 Promotion (Dr. rer. nat.) am Institut für
Molekularbiologie der Universität Essen-Duisburg

Sept/ 1999-Sept/2000 Diplomarbeit am Uniklinikum Essen in der Inneren Klinik-
Tumorforschung im Labor von Herrn Prof. Seeber zum Thema:
Immunchemische und immunhistochemische Charakterisierung
von intraoperativ freigesetzten Tumorzellen bei
Leberresektionen.

Okt/1995-Nov/2000 Studium der Biologie (Dipl.) an der
Ruhr-Universität-Bochum

20.09.2000 Abschluss: Dipl. Biologie

Schulausbildung

1986-1995 Rhein-Sieg-Gymnasium, St. Augustin
13.06.1995 Allgemeine Hochschulreife
1982-1986 Grundschule Menden Mittelstr.

Essen, den 06.10.2004

10. Erklärungen

Erklärung zu § 6, Abs. 2, Nr. 7:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „**Untersuchungen zur Struktur, Lokalisation und Funktion des zellulären Proteins r-SREC, das mit adenoviralen E1A-Proteinen interagiert**“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Katja-Patricia Schoppmeyer befürworte.

Essen, den _____
(Prof. Dr. H. Esche)

Erklärung zu § 6, Abs. 2, Nr. 6:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____
(Katja-P. Schoppmeyer)

Erklärung zu § 6, Abs. 2, Nr. 8:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den _____
(Katja-P. Schoppmeyer)