

**E1A als potentielles Gentherapeutikum HHV-8-positiver  
Tumore: Evaluation mit HHV-8-Promotorelementen in  
HHV-8-positiven und –negativen Zellen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs  
Bio- und Geowissenschaften,  
Landschaftsarchitektur

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Karin Köhler-Hansner

aus Trier

August 2005

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden in der Inneren Klinik/Tumorforschung der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Opalka

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Esche

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. M. Ehrmann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2005

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Bertram Opalka gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für sein stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit und für seine Unterstützung, sowohl wissenschaftlicher als auch ideeller Art, die ich während der vergangenen Jahre erfahren habe.

Herrn PD Dr. Hans-Christoph Kirch danke ich für die Überlassung des sehr interessanten Themas und für die praktische Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Ulrich R. Hengge danke ich für die sowohl wissenschaftliche als auch finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. H. Esche für seine fachlichen Anregungen.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der Inneren Klinik/Tumorforschung aus den Arbeitsgruppen Opalka/Kirch und Flasshove/Moritz für die stets gute Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Dr. Walter Bardenheuer, Frau Dr. Uschi Sorg, Frau Veronika Kleff und Frau Ina Rattmann.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der Universitätshautklinik Düsseldorf aus der Arbeitsgruppe von Prof. Hengge für den regen Wissensaustausch während der Durchführung dieser Arbeit.

Ich danke Dr. O. Flore und ihren Mitarbeitern für die freundliche Aufnahme und Unterstützung während meines Forschungsaufenthaltes in New York.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. Reinhard Depping für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Weiterhin gilt mein aufrichtiger Dank meiner Familie, insbesondere meinen Geschwistern Herrn Jürgen Köhler und Frau Christel Köhler-Hohmann, für die fortwährende ideelle Unterstützung während der letzten Jahre.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Mann Herrn Dr. Thomas Hansner für seine stetige Unterstützung, sowohl fachlicher als auch persönlicher Art, und für seine große Geduld bedanken.

Mein Dank gilt auch der Joachim-Kuhlmann-Stiftung, die dieses Projekt gefördert hat.

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
1 Einleitung.....	1
1.1 Herpesviren.....	2
1.2 Das Humane Herpesvirus 8 (HHV-8) / Kaposi-Sarkom-assoziierte Virus (KSHV).....	4
1.2.1 Virale Gene, die zur Latenz des HHV-8 beitragen .....	6
1.3 Adenoviren .....	9
1.4 Die Region E1A.....	10
1.4.1 Einfluss von E1A auf die Transkription viraler und zellulärer Gene.....	12
1.4.2 Koexpression von E1A-Proteinen mit einem Apoptoseinhibitor .....	15
1.5 Tumorsuppression durch E1A.....	16
1.5.1 Induktion von Apoptose durch E1A.....	17
1.6 Sensibilisierung von Tumorzellen gegenüber Strahlen und Zytostatika durch E1A-Proteine .....	19
1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	20
2 Material.....	22
2.1 Chemikalien .....	22
2.2 Kits .....	23
2.3 Enzyme, Enzympuffer und Proteine .....	23
2.4 Antikörper .....	24
2.5 Nukleinsäuren .....	24
2.6 Vektoren.....	24
2.7 Plasmide .....	25
2.8 Molekulargewichtstandards (Protein/DNA).....	27
2.9 Bakterienstämme (E.coli) .....	27
2.10 Zelllinien .....	27
2.11 Zellkulturmaterialien .....	28
2.12 Nährmedien und Zellkulturlösungen.....	29
2.13 Verbrauchsmaterialien .....	30
2.14 Spezielle Geräte.....	30
2.15 Verwendete Puffer und Lösungen.....	31
2.16 Oligonukleotide.....	32
3 Methoden .....	34
3.1 Klonierungstechniken .....	34
3.1.1 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien .....	34
3.1.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Bakterien.....	35
3.1.3 Messung der DNA-Konzentration.....	36
3.1.4 Restriktionsverdau von DNA .....	37
3.1.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel.....	37
3.1.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	37
3.1.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten über eine Säule .....	38
3.1.8 Ligation von DNA mit überhängenden Enden .....	38
3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) .....	39
3.2.1 PCR zu Isolierung von DNA-Klonen.....	39

3.2.2	Identifizierung Insert-positiver Bakterienklone mit Hilfe der PCR (PCR-Screening) .....	41
3.2.3	Quantitative PCR .....	42
3.3	Kultivierung von Zelllinien.....	42
3.3.1	Bestimmung der Zellzahl.....	43
3.4	Aufreinigung des HHV-8-Virus .....	44
3.4.1	Vermehrung der Viren.....	44
3.4.2	Isolation der Viren .....	44
3.5	Infektion von HUVEC-Zellen mit HHV-8 .....	46
3.6	Transfektion von Zellen .....	46
3.6.1	Elektroporation .....	46
3.6.2	Transfektion mit Polyethylenimin.....	47
3.6.3	Lipofektion.....	49
3.7	Bestimmung der Luciferase-Reportergen-Aktivität in Zellextrakten.....	49
3.8	Proteinchemische Methoden .....	51
3.8.1	Herstellung von Proteinextrakten aus Eukaryontenzellen .....	51
3.8.2	Proteinquantifizierung .....	51
3.8.3	Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen .....	52
3.8.4	Western Blotting (Harlow und Lane, 1988) .....	52
3.9	Messung der <i>in vitro</i> -Zytotoxizität mit dem MTT-Test.....	53
3.9.1	Zytotoxizitätstest nach transienter Transfektion mit E1A.....	53
3.9.2	Zytotoxizitätstest nach Behandlung mit Cyclophosphamid .....	54
3.10	Statistische Analyse .....	54
4	Ergebnisse .....	56
4.1	Überprüfung der Regulation von LANAp durch E1A in HHV-8-infizierten Zellen .....	57
4.1.1	Bestimmung des isolierten Virustiters .....	57
4.1.2	Konzentrationsbestimmung der isolierten HHV-8-Partikel .....	58
4.2	Promotorkonstrukte .....	61
4.2.1	Deletionsmutanten des LANAp .....	62
4.2.2	Der del -653-AP-2-Promotor.....	64
4.3	Funktionalität und Vergleich der Basisaktivität verschiedener Promotorkonstrukte .....	68
4.4	Einfluss der Expression von genomischem Ad5 E1A auf die Aktivität des LANAp und seiner Derivate.....	71
4.5	Für Regulationsanalysen verwendete E1A-Konstrukte .....	74
4.6	Einfluss der Expression verschiedener E1A-Wildtypen und E1A-Deletionsmutanten auf die Aktivität von LANAp-Konstrukten in der Melanomzelllinie MV3 .....	75
4.6.1	Einfluss von Ad12- und Ad2-E1A-Konstrukten auf die Aktivität des WT LANAp .....	75
4.6.2	Einfluss von Ad12-E1A, Ad2 E1A und der Spm2-Mutante auf die Aktivität des del -262-LANAp-Konstrukts .....	77
4.6.3	Einfluss von Ad12 E1A, Ad2 E1A und der Spm2-Mutante auf die Aktivität weiterer LANAp-Konstrukte .....	78
4.6.4	Einfluss von Ad5 E1A und Ad12 E1A-Konstrukten auf die Aktivität des WT LANAp .....	81
4.6.5	Einfluss von Ad12 E1A, Ad2 E1A und der Spm2-Mutante auf die Aktivität des del -263-AP-2-Promotors .....	82

4.6.6	Einfluss von Ad12-, Ad2-E1A und der Spm2-Mutante auf die Aktivität des <i>Hsp70</i> -Promotors.....	84
4.6.7	Einfluss von Ad12 E1A, Ad2 E1A und der Spm2-Mutante auf die Aktivität des humanen TERT-Promotors.....	86
4.6.8	Einfluss von Ad12 E1A, Ad2 E1A der Spm2-Mutante auf die Aktivität des SV40-Promotors .....	87
4.7	Einfluss der Expression von Ad2 E1A und der Spm2-Mutante auf die Aktivität von Promotoren in B-Lymphozyten.....	89
4.7.1	Einfluss der Expression von Ad2 E1A auf die Aktivität des WT LANAp in der HHV-8-positiven Zelllinie BC-3 .....	89
4.7.2	Einfluss der Expression der Ad12 Spm2-Mutante bzw. von Ad2 E1A auf die Aktivität des LANAp in der HHV-8-positiven Zelllinie BC-3.....	91
4.7.3	Einfluss der Expression der Ad12 Spm2-Mutante auf die Aktivität des <i>Hsp70</i> - und des humanen TERT-Promotors in der HHV-8-positiven Zelllinie BC-3.....	93
4.7.4	Einfluss der Expression von Ad2 E1A auf die Aktivität des WT LANAp in der HHV-8-negativen B-Zelllinie RPMI8226 .....	95
4.8	Einfluss der Expression der latenten Gene von HHV-8 auf die Aktivierung des WT LANAp durch E1A .....	97
4.8.1	Einfluss der Expression der latenten Gene von HHV-8 auf die Aktivierung des WT LANAp durch die Ad12 Spm2-Mutante .....	97
4.9	Einfluss von E1A auf das Überleben der HHV-8-positiven BC-3-Zellen.....	99
4.9.1	Einfluss von Ad12 E1A und Ad12 Spm2 auf das Überleben der HHV-8-positiven B-Lymphozytenzelllinie BC-3 .....	99
4.9.2	Überprüfung der Chemosensibilisierung der HHV-8-positiven B-Lymphozyten BC-3 durch Ad12 E1A.....	103
4.9.3	Überprüfung der Chemosensibilisierung der HHV-8-positiven B-Lymphozyten BC-3 durch die Ad12 Spm2-Mutante .....	105
5	Diskussion .....	108
5.1	Basale Aktivität des LANAp in verschiedenen Zelllinien.....	110
5.2	Aktivität des LANAp unter dem Einfluss der Expression von Ad5 E1A-Proteinen .....	117
5.3	Aktivierung des LANAp durch verschiedene Ad2-, Ad5- und Ad12-E1A-Derivate.....	118
5.4	Einfluss von Ad12 E1A und Ad12 Spm2 auf die HHV-8-positiven B-Lymphozyten BC-3.....	124
5.5	Ausblick und Zusammenfassung.....	128
6	Literatur .....	131
Anhang	.....	155
Abbildungsverzeichnis	.....	156
Tabellenverzeichnis	.....	158
Publikationen	.....	159
Lebenslauf	.....	160
Erklärungen	.....	161

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Alpha
A	Adenin
A. bidest	Aqua bidest (zweifach destilliertes Wasser)
Ad	humanpathogene Adenoviren
AIDS	erworbenes Immundefektsyndrom (Acquired Immune Deficiency Syndrome)
amol	Attomol
AP	Aktivator Protein
AR	Hilfsregion (auxilliary region)
AS	Aminosäure
Az	Aktenzeichen
$\beta$	Beta
BCBL	Primäres Effusionslymphom (Body Cavity Based Lymphoma)
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
C	Konzentration
ca.	cirka
CAR	Coxsackie Virus B Ad-Rezeptor (CAR)
CBP	CREB bindendes Protein
cDNA	zur RNA komplementäre DNA (complementary DNA)
Cl	Chlorid
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CMV	Cytomeglievirus
CoA	Coenzym A
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CR	Konservierte Region (conserved region)
CREB	Protein, dass an das cAMP-empfindliche Element bindet (cAMP responsive element binding protein)
CtBP	C-Terminus bindendes Protein (C-terminal binding protein)

C-Terminus	Carboxyterminus
Cyc	Cyclin
Da	Dalton (atomare Masseneinheit, 1 Da = $1,66 \times 10^{-24}$ g)
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMEM	„Dulbecco's Modification of Eagles Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	2'-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
dTTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
E	Extinktion
EBNA1	Epstein-Barr nukleäres Antigen 1
EBV	Ebstein-Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E1A/E1B	Frühe Region 1A/1B (early region 1A/1B)
EF	Endotoxinfrei
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FKS	fötales Kälber-Serum
$\gamma$	Gamma
G	Gramm
G	Guanin
h	stunde (hour)
HDAC	Histon-Deacetylase
HHV	Humane Herpesviren
HHV-6	Humanes Herpesvirus 6
HHV-7	Humanes Herpesvirus 7
HHV-8	Humanes Herpesvirus 8
HIV	„Human Immunodeficiency Virus“
HPV	humanes Papillomavirus
Hsp70	Hitzeschockprotein 70 (heat shock protein 70)
HSV	Herpes simplex Virus (HSV)
HTLV	humanes T-Zell-Leukämie-Virus-1

kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
KDa	Kilodalton
KS	Kaposi-Sarkom
KSHV	Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus
$\lambda$	Lambda
LANA	Latenz-assoziiertes nukleäres Antigen (latency associated nuclear antigen)
LB	Luria Bertania (Bakterienkulturmedium)
LT1	latentes Transkript 1
LT2	latentes Transkript 2
M	Molar
MA	Milliampere
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
MLP	“major late promoter”
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
$\mu$ F	Mikrofarad
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
Na	Natrium
NF- $\kappa$ B	Nukleärer Faktor $\kappa$ B (nuclear factor $\kappa$ B)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NRK-Zellen	Rattenfibroblasten
N-Terminus	Aminoterminus
o.a.	oben angegeben
O.D.	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
%	Prozent

P	Protein
PARP	Poly(ADP-ribose) Polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCNA	„proliferating cell nuclear antigen“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglycol
pH	pH-Wert ( $\text{pH} = -\log_{10} [\text{Protonenkonzentration (mol/l)}]$ )
PEI	Polyethylenimin
PEL	Primäres Effusionslymphom
pmol	Pikomol
pRB	Retinoblastom-Protein
R	Aminosäurerest
RLU	Relative Luciferaseeinheit (relative light units)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Svedberg-Einheit (Sedimentationskoeffizient)
S2	Sicherheitsstufe 2
S.E.M.	Standardfehler des arithmetischen Mittels
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
T	Thymin
$T_m$	Schmelztemperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Na-Acetat/EDTA
TBP	TATA-Box bindendes Protein
TE	Tris-EDTA
TF	Transkriptionsfaktor
TIMP	„Tissue Inhibitor of MMP“
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	Tetraphorbolacetat
TR	terminale Einheit (Terminal Repeat)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit

---

u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
vCyc	virales Cyklin
VEGF	vaskulärer, endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
vIRF3	virales Interferon 3
Vol	Volumen
(v/v)	Volumen/Volumen
VZV	Varizellen zoster Virus
(w/v)	Gewicht/Volumen
x	-fach

## 1 Einleitung

Die Entstehung von Tumoren beruht auf diversen Ursachen, wie unter anderem die Infektion des Menschen mit verschiedenen Viren. Allerdings sind die Mechanismen, die mit einem vergrößerten Risiko der Tumorerkrankung durch Viren verbunden sind teils noch unklar (Wagener, 1999). Beispielsweise konnte für gewisse Typen des humanen Papillomavirus (HPV) und des humanen T-Zell-Leukämie-Virus-1 (HTLV-1) eine enge Beziehung zwischen der Infektion von Zellen durch das Virusgenom und der Tumorentstehung bestätigt werden. Durch HTLV-1-Infektionen wird das Erkrankungsrisiko an T-Zell-Lymphomen oder T-Zell-Leukämien erhöht (Wagener, 1999). Papillomaviren sind primär an der Entstehung genitaler Tumoren, wie dem Zervixkarzinom, beteiligt.

Durch die Infektion mit Hepatitis-B-Viren kommt es über eine Entzündungsreaktion und den Untergang der Zellen zu einer gesteigerten Leberzelldegeneration. Zellen, die mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) infiziert sind, haben eine erhöhte Proliferationsrate und somit ein vergrößertes Risiko somatischer Mutationen. Die Sauerstoffradikale, die durch Entzündungsreaktionen entstehen, könnten ebenfalls zu genetischen Veränderungen führen. Die Häufigkeit von Non-Hodgkin-Lymphomen bei HIV-1-Infektionen ist durch eine Immundefizienz und ist damit nicht unmittelbar mit der Virusinfektion der Tumorzellen zu erklären. Der größte Anteil der Lymphome entsteht durch die Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus oder durch die Formation bestimmter Translokationen (Wagener, 1999). Die Entstehung des Kaposi-Sarkoms ist mit der Infektion des humanen Herpes-Virus-8 (HHV-8) assoziiert. HHV-8 ist verwandt mit dem Epstein-Barr-Virus und dem Herpesvirus saimiri (Offermann, 1996) und wurde erstmalig 1994 mit der Entstehung des AIDS-assoziierten Kaposi-Sarkoms in Verbindung gebracht. Seitdem wurde es aber in allen epidemiologischen Formen des Kaposi-Sarkoms (Chang *et al.*, 1996) und auch in einer Vielzahl von lymphoproliferativen Erkrankungen entdeckt (Dittmer *et al.*, 1998). Unter allen anderen Arten des KS, einschließlich dem iatrogenen KS, das bei immunsupprimierten Transplantationspatienten auftritt, stellt das AIDS-KS eine wesentlich aggressivere, streuendere und resistere Form gegenüber einer Therapie dar (Foreman, 2001). Weiterhin konnten virale Onkogene identifiziert

werden, deren Genprodukte die Transkription sowohl zellulärer als auch viraler Gene aktivieren oder supprimieren können, wie das adenovirale E1A-Protein (Nevins, 1990; Gallimore und Turnell, 2001). Durch den Transfer des adenoviralen Onkogens E1A, das bereits erfolgreich in klinischen Studien eingesetzt wird und sich als effizienter Tumorsuppressor erwiesen hat, stellt hier die Gentherapie eine alternative oder additive Therapiemöglichkeit dar.

## 1.1 Herpesviren

Menschliche Tumore wurden den beiden Mitgliedern der Herpesvirusfamilie, dem Humanen Herpesvirus 8 (Kaposi-Sarkom, primäres Effusionslymphom und Morbus Castleman) und dem EBV (Burkitt-Lymphom, Nasopharyngales Karzinom, Hodgkin und Non-Hodgkin-Lymphom) zugeordnet (Thompson und Kurzrock, 2004). EBV wurde 1964 zum ersten Mal in einer Zelllinie aus einem Burkitt-Lymphom entdeckt (Epstein *et al.*, 1964). 30 Jahre später wurde von der Entdeckung eines neuen Herpesvirus, dem HHV-8, in Gewebe aus einem Kaposi-Sarkom berichtet (Chang *et al.*, 1994).

Es ist bekannt, dass mehr als 90 % der erwachsenen Weltbevölkerung mit EBV infiziert sind (Thompson und Kurzrock, 2004). Die Seroprävalenz von HHV-8 beträgt dagegen nur 5 % in der allgemeinen Bevölkerung West Europas und den USA. Aber in Bevölkerungsgruppen mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung des Kaposi-Sarkoms, wie männlichen Homosexuellen oder der Bevölkerung Zentralafrikas, ist die Durchseuchung mit HHV-8 signifikant höher (Cathomas, 2003). EBV wird durch Speichelkontakt übertragen (Thompson und Kurzrock, 2004). Bei HHV-8 hingegen ist der Übertragungsweg noch nicht vollkommen aufgeklärt, es wird aber eine sexuelle Transmission angenommen (Dourmishev *et al.*, 2003).

Die Familie der Herpesviren nimmt einen sehr wichtigen Platz in der Reihe der humanpathogenen Viren ein (Fleury, 2002).

Diese DNA-Viren weisen die Eigenheit auf, nach einer akuten Primärinfektion in latentem Zustand in den infizierten Zellen als zirkuläres Episom zu persistieren (Dittmer *et al.*, 1998). Das Virus kann unter gewissen Umständen reaktiviert werden,

was durch psychologische (wie Stress), physikalische (wie UV-Strahlung), hormonelle (wie Menstruation) und immunogene Faktoren (wie eine Immunschwäche), induziert oder begünstigt wird (Fleury, 2002).

Die *Herpesviridae* lassen sich aufgrund ihrer Pathogenität, der Zelltypen, die sie infizieren und ihrer Vermehrungseigenschaften in drei Subfamilien einteilen:  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Herpesviren (Günzburg und Salomons, 1997).

Die breite Gruppe der Herpesviren umfasst das Herpes simplex Virus (HSV) vom Typ 1 und 2, welche sich in antigener und epidemiologischer Hinsicht unterscheiden. HSV-1 wird auf oralem Weg übertragen. Die Ansteckung mit HSV-2 erfolgt über sexuelle Kontakte und manifestiert sich auf den Genitalien oder manchmal auch am Gesäß oder auf den Schenkeln (Fleury, 2002).

Weiterhin gehört das „Varizella zoster“-Virus (VZV) zu den Herpesviren. Nach der Erstinfektion, apparent unter dem Bild der Windpocken, persistiert das Virus während Jahren latent in einem oder mehreren Spinalganglien. Eine Reaktivierung ist mit Komplikationen wie Zosterschmerzen oder Gesichtslähmungen verbunden (Fleury, 2002). Das bereits oben erwähnte Epstein-Barr-Virus (EBV) ist für die infektiöse Mononukleose verantwortlich (Fleury, 2002).

Die Unterfamilie der  $\gamma$ -Herpesviren ist lymphotroph, manche von diesen Viren sind in der Lage den lytischen Replikationszyklus in Epithelzellen und/oder Fibroblasten zu starten. Man bezeichnet sie auch als Humane Herpesviren (HHV) und sie wurden erst vor kurzem entdeckt. Das HHV-6 ist der Auslöser einer Roseola oder des Dreitagefiebers im Kindesalter von sechs Monaten bis drei Jahren. Die Pathogenität von HHV-7 konnte bisher nicht genau geklärt werden (Fleury, 2002) und das bereits erwähnte HHV-8 wird mit der Entstehung lymphoproliferativer Erkrankungen assoziiert.

Herpesviren besitzen eine Hülle mit einem Durchmesser von 100 - 180 nm. In der Hülle befindet sich ein ringförmiger Proteinkern, in dem die lineare doppelsträngige DNA mit einer Größe von 125 – 229 kb lokalisiert ist. Die DNA ist in dem ikosaedrischen Capsid an Fibrillen fixiert. Das Capsid besteht aus 162 Capsomeren und ist von einem globulären Tegument umgeben. Ihre fragile Hülle erhalten sie durch „Budding“ an der mit viralen Glykoproteinen besetzten Membran des Nukleus (Günzburg und Salomons, 1997).

Herpesviren kodieren die meisten Enzyme, die für ihre Replikation oder für den latenten Status nötig sind, selbst. Weiterhin sind sie in der Lage, sich auch in

ruhenden Zellen wie bsp. Neuronen zu replizieren (Günzburg und Salomons, 1997). Die Hälfte der Herpesvirusgene sind für die Replikation nicht notwendig, werden aber für die Ausweitung des Gewebetropismus, bei der Etablierung der Latenz oder bei der Unterdrückung der Immunantwort des Wirtes *in vivo* benötigt (Günzburg und Salomons, 1997).

## **1.2 Das Humane Herpesvirus 8 (HHV-8) / Kaposi-Sarkom-assoziierte Virus (KSHV)**

Unter den oben bereits erwähnten  $\gamma$ -Herpesviren wiederum gibt es zwei Unterfamilien: die Lymphokrypto-Viren oder  $\gamma$ -1-Herpesviren mit dem EBV und die Rhadinoviren oder  $\gamma$ -2-Herpesviren mit dem HHV-8 (Damania, 2004, Melendez *et al.*, 1968; Chang *et al.*, 1994). HHV-8 wurde zunächst ausschließlich in Proben von Biopsien gefunden (Chang *et al.*, 1994).

HHV-8 ist mit der Entstehung von Neoplasien, verschiedenen malignen Erkrankungen und lymphoproliferativen Erkrankungen der B- und / oder T-Zellen assoziiert, wie dem Primären Effusionslymphom (PEL oder BCBL) (Cesarman *et al.*, 1995), Morbus Castleman (Gessain *et al.*, 1995) und den mit HHV-8 assoziierten Plasmablastischen Lymphomen (Dupin *et al.*, 2000). Weiterhin wird HHV-8 mit vaskulären Endotheliosarkomen wie dem Kaposi-Sarkom in Verbindung gebracht (Damania, 2004). Seroepidemiologische wie auch auf PCR basierende Untersuchungen an Patienten mit diesen Erkrankungen bestätigten, dass die virale Infektion mit HHV-8 das ursächliche Agens der Entstehung des Kaposi-Sarkoms ist. Die HHV-8-Infektion stellt außerdem ein höheres Risiko für die Tumorentwicklung dar (Whitby *et al.*, 1995).

Das Genom von HHV-8 besteht aus einer doppelsträngigen DNA mit ca. 165 kb, die von G- und C-reichen terminalen „Repeats“ (TR)-Einheiten flankiert werden (Renne *et al.*, 1996). Ein großer Teil des Genoms trägt Gene, die für die virale Replikation kodieren und Strukturproteine exprimieren. Solche Gene sind unter Herpesviren konserviert (Cesarman *et al.*, 1996). Zwischen diesen konservierten Genen liegen divergente Regionen, die für eine Reihe von einzigartigen viralen Proteinen kodieren,

welche die Regulation des Zellzyklus mimikrieren, wie auch für Proteine, die für die Signaltransduktion zuständig sind (Russo *et al.*, 1996). Wie andere Herpesviren auch, kann HHV-8 zwei verschiedene Replikationszyklen einschlagen, die lytische Replikation oder die Latenz. Die überwiegende Zeit liegen die Viren in ihrem natürlichen Wirt in der latenten Phase vor (Chang *et al.*, 1996). Diese ist charakterisiert durch die Persistenz des viralen Genoms als ein kovalent geschlossenes zirkuläres Episom mit begrenzter viraler Genexpression (Roizman, 1993). Das Epstein-Barr nukleäre Antigen (EBNA 1) von EBV und das latente nukleäre Antigen von HHV-8 haben eine wichtige Funktion in Bezug auf die Aufrechterhaltung des viralen Episoms und der Immortalisierung der infizierten Zelle (Klein, 1994; Grundhoff und Ganem, 2003; Verma *et al.*, 2004).

Es wird angenommen, dass sowohl die latenten als auch die lytischen Gene durch Transformation und/oder durch parakrine Mechanismen zu der viralen Onkogenese beitragen. Die ursprünglich normalen Zellen proliferieren folglich in unkontrollierter Weise (Damania, 2004).

Obwohl die Expressionsprofile der viralen Gene in lytische und latente Gene differenziert werden können, werden viele Gene der  $\gamma$ -Herpesviren in beiden Phasen des viralen Replikationszyklus transkribiert, wie das Kaposin von HHV-8. Die viralen Gene wurden in drei Klassen eingeteilt (Sarid *et al.*, 1998): Die Gene der Klasse I werden während des latenten Replikationszyklus exprimiert. Gene der Klasse III kodieren hauptsächlich für virale Struktur- und Replikationsproteine und die Gene der Klasse II stellen Gene für die typische Regulation der Herpesviren und für die virale DNA-Replikation dar, sowie virale Homologe von zellulären Genen (Sarid *et al.*, 1998).

Während der lytischen Replikation werden alle viralen Proteine exprimiert, und virale Partikel werden aus der Wirtszelle freigesetzt, was letztendlich in der Zerstörung der Wirtszelle endet. Während der latenten Infektion werden nur bestimmte virale Gene für die Funktion und die Aufrechterhaltung der Latenz exprimiert (Zhong *et al.*, 1996). In Zellen des Kaposi-Sarkoms persistiert HHV-8 latent in dem größten Teil der Tumorzellen, wovon weniger als 5% der Zellen einer spontanen lytischen Replikation unterliegen (Dittmer *et al.*, 1998).

Das Muster der Genexpression des lytischen Zyklus lässt eine Hierarchie von unvollkommener lytischer Entwicklung vermuten, in der manche Zellen nur ein lytisches Gen exprimieren, wie vIL-6, oder nur die frühen lytischen Gene,

einschließlich der frühen transkriptionellen Regulatoren und einem oder mehreren viralen  $\beta$ -Chemokinen, wie vMIP (Hayward, 2003). Eine geringere Anzahl von Zellen exprimiert zusätzlich die Schlüsselproteine für die DNA-Replikation und das späte vGPCR. Wenige oder gar keine Zellen exprimieren das späte Protein gpK8.1. Daher ist davon auszugehen, dass in einigen dieser erfolglosen lytischen Stadien die Zellen weiterhin überleben oder der Zelltod zumindest hinausgezögert wird (Hayward, 2003).

### 1.2.1 Virale Gene, die zur Latenz des HHV-8 beitragen

Zwei Transkripte, die am rechten Ende des Genoms kodiert sind, zeigen die gleiche Expressionsstärke in TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat)-behandelten und unbehandelten BC-1-Zellen. Bei TPA handelt es sich um ein Agens, das die Tumorentstehung fördert und die lytische Replikation induziert (Renne *et al.*, 1996B). Die beiden Transkripte werden als latente (Klasse I)-Transkripte (Sarid *et al.*, 1998) bezeichnet. Das größere Transkript mit 6,0 kbp, das als latentes Transkript 1 (LT1) bezeichnet wird, kodiert für den ORF73 (offener Leserahmen oder „open reading frame“), ORF72 (vCyc) und ORFK13 (vFLIP), während das kleinere Transkript mit 2,0 kbp, das als LT2 bezeichnet wird, nur für den ORF72 und den ORFK13 kodiert, nicht aber für den ORF73.

Die Proteine und Gene, die mit der latenten Infektion assoziiert sind, bestehen aus dem „latency associated nuclear antigen 1“ (LANA-1; ORF 73), dem viralen Cyklin (ORF 72) und aus dem viralen „Fas-associated death domain-like interleukin 1  $\gamma$ -converting enzyme inhibitory protein“ (vFLIP; ORF 71 oder ORF K13). Alle drei Gene liegen an einem Ort innerhalb des HHV-8-Genoms beisammen (Dittmer *et al.*, 1998). Die Expression des „latency associated nuclear antigen“ (LANA), vCyc, vFLIP, ORFK15 und LANA2 (vIRF3) während der Latenz und die Anwesenheit des Virus selbst scheinen eine Mindestanforderung für die Tumorausbildung zu sein (Cesarman und Knowles, 1997) und sind zudem eng verbunden mit der Wachstumsaktivität der HHV-8-positiven B-Lymphozytenlinie.

Es wird angenommen, dass das Genom von HHV-8 während der latenten Replikation einmal pro Zellzyklus synchron mit der Wirtszelle repliziert wird, wie dies bereits für EBV berichtet wurde (Adams, 1987). Es konnte gezeigt werden, dass das HHV-8-Genom zwei nukleäre Lokalisationssignale trägt, jeweils eines in der C-terminalen Region und eines in der N-terminalen Region.

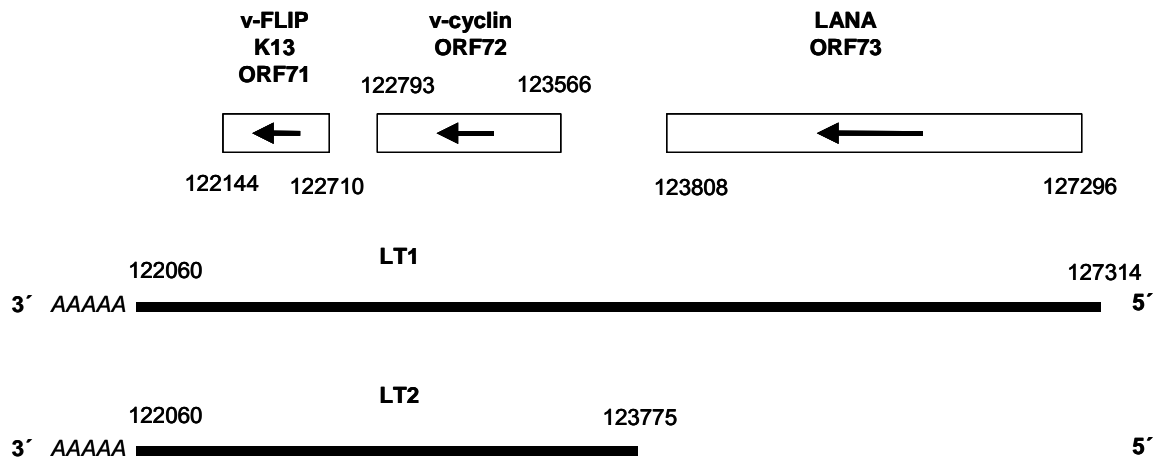
LANA übt eine Vielzahl von Funktionen in Bezug auf die Transkription und Replikation der viralen episomalen DNA aus. Während der Interphase und der Mitose verbindet LANA die zirkuläre, virale DNA mit dem Chromatin der Wirtszelle (Ballestas *et al.*, 1999). Der C-Terminus von LANA wird für die Dimerisierung an zwei Motive, mit einer Größe von 17 bp innerhalb des Terminalen „Repeats“ (TR) von HHV-8 (Schwam *et al.*, 2000) und für die Bindung an die DNA benötigt. Die Expression des C-terminalen Fragments von LANA ist ausreichend für die Replikation des latenten Episoms (Garber *et al.*, 2002). Außerdem interagiert LANA mit p53 und supprimiert dessen transkriptionelle Aktivität sowie die Fähigkeit von p53, Apoptose zu induzieren (Friborg *et al.*, 1999). Weiterhin bindet LANA an das Retinoblastom Protein (pRb) in dessen „pocket region“ und setzt dadurch E2F frei. E2F ist ein Protein, das für die Regulation von Genen zuständig ist und es agiert als Kofaktor der Transkription, in dem es die Transkription von Genen aktiviert, die für die Progression des Zellzyklus zuständig sind (Radkov *et al.*, 2000).

LANA stimuliert weiterhin die zelluläre Transformation (Radkov *et al.*, 2000).

Ein HHV-8-Gen, dessen Transkription von dem gleichen Promotor reguliert wird wie LANA, ist das Genprodukt von ORF72: das v-Cyclin (vCyc) (Reed *et al.*, 1998). Dieses Gen ist dem humanen Cyclin D2 verwandt. vCyc ist ein funktionelles Cyclin, das in der Lage ist, das pRb zu phosphorylieren und dieses in seiner Funktion als Zellzyklusarrest in der G1-Phase zu inaktivieren. Auch das Histon H1 kann durch vCyc phosphoryliert werden (Chang *et al.*, 1996). Durch die Expression von vCyc überwinden die infizierten Zellen den G1-Arrest, und die Zellen durchlaufen den Zellzyklus (Swanton *et al.*, 1997).

Das dritte Gen, das in der Mehrheit der latent infizierten KS-Spindelzellen exprimiert wird, ist das vom ORF13 exprimierte vFLIP (Sturzl *et al.*, 1999). Es wird manchmal auch als ORF71 bezeichnet. Es schützt die Zellen vor der Fas-induzierten Apoptose und beeinflusst also das Überleben der Zelle. Es fördert das Tumorstadium, in dem es den NF $\kappa$ B-Signalweg aktiviert (Bertin *et al.*, 1997; Thome *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2002). Es wird angenommen, dass die konstitutive Expression von NF- $\kappa$ B die

transformierende Funktion von EBV ist. Außerdem ist NF- $\kappa$ B in PEL (Primäres Effusions-Lymphom)-Zelllinien konstitutiv aktiviert (Mosialos, 1997). Die Inhibierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B durch die supprimierte Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  führt zu der Induktion von Apoptose in HHV-8-infizierten Zellen (Keller *et al.*, 2000).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Transkripte LT1 und LT2.** Die Anordnung und die Orientierung für diese Region des HHV-8-Genoms ist angegeben. Die Zahlen beziehen sich auf die Nukleotidpositionen nach Russo *et al.* (1996). Die schwarzen Balken stellen die Transkripte LT1 und LT2 dar (modifiziert nach Sarid *et al.*, 1999).

Ein mögliches Modell für die Induktion von Apoptose in den HHV-8-positiven Zellen ist die Unterbrechung des latenten Lebenszyklus von HHV-8 durch die Suppression des Promotors der latenten Gene von HHV-8 (LANAp). Dadurch könnte die Expression der drei latenten Gene von HHV-8 gehemmt werden und zum einen die Replikation des viralen Episoms inhibiert und Apoptose über verschiedene Wege induziert werden (Swanton *et al.*, 1997, Thome *et al.*, 1997; Friborg *et al.*, 1999; Garber *et al.*, 2002).

In der Gruppe der humanen Adenoviren (Ad), die ebenfalls häufig latent in Lymphozyten persistieren (Ginsberg, 1999) wurde ein Protein, mit der Bezeichnung E1A identifiziert, dass in der Lage ist, sowohl zelluläre als auch virale Gene zu supprimieren. Außerdem ist das adenovirale E1A-Protein ein potenter Tumorsuppressor, der Apoptose in malignen Zellen induzieren kann.

### 1.3 Adenoviren

Weitere Onkogene, die seit vielen Jahren Gegenstand intensiver molekularbiologischer Forschung sind, sind die E1A- und E1B-Gene der Adenoviren. Die Genprodukte von E1A weisen eine Vielzahl von biologischen Aktivitäten auf, wie transkriptionelle Aktivierung, transkriptionelle Repression, Induktion von DNA-Synthese, Mitose und Apoptose in ruhenden Nagerzellen, Suppression der Differenzierung, Immortalisierung in primären Nagerzellen und Transformation in Kooperation mit den viralen E1B-Produkten oder aktiviertem Ras (Bayley und Mymryk, 1994).

Humanpathogene Adenoviren wurden zuerst aus Rachenmandelgewebe isoliert (Rowe *et al.*, 1953). Die beim Menschen verursachten Infektionen betreffen den respiratorischen Trakt, den Gastrointestinaltrakt, die Harnwege oder das Auge und verlaufen zumeist mild. Die unterschiedlichen humanen Adenovirus-Serotypen wurden zunächst nach ihrer Fähigkeit, in verschiedenem Maße Tumore in Nagetieren zu induzieren, in Gruppen (Subgenera A – F) eingeteilt (Horwitz, 1990). Diese Unterteilung wurde durch die Klassifizierung der etwa 100 identifizierten Virussubtypen hinsichtlich ihres unterschiedlichen onkogenen Potentials abgelöst. Adenoviren sind von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben und haben einen Durchmesser von ca. 60 – 90 nm. Das Genom besteht aus einer linearen, doppelsträngigen DNA mit einer Länge von 36 – 38 kbp. Es ist zusätzlich mit verschiedenen Proteinen assoziiert, welche hauptsächlich für die Verpackung des Genoms verantwortlich sind (Shenk, 1996).

Während der Infektion kommt es zu Wechselwirkungen viraler Fiberproteine mit einem primären Rezeptor auf der Zelloberfläche, dem Coxsackie Virus B Ad-Rezeptor (CAR). CAR ist ein wichtiger Rezeptor für die Infektion einer Vielzahl von Zellen, einschließlich der respiratorischen Endothel- und Epithelzellen durch Adenoviren. Nach der Anlagerung des Viruspartikels kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen Pentonbasisproteinen und zellulären Integrinen ( $\alpha\beta3$  und  $\alpha\beta5$ ). Danach wird das Viruspartikel über clathrinbedeckte Einstülpungen der Zellmembran in ein Endosom überführt (Meier und Greber, 2004). Die Endosomen

werden angesäuert und es kommt zu einer Konformationsänderung der viralen Capsidproteine. Dies führt zu der Freisetzung des Virus-Core in das Cytoplasma, dessen Transport in den Nukleus durch die Core-Proteine ermöglicht wird. Dort persistiert die virale DNA als Episom (Günzburg und Salomons, 1997).

Die adenovirale Infektion kann in eine frühe und eine späte Phase unterteilt werden: in der frühen Phase wird die sehr frühe Region 1A („immediate Early Region 1A“, E1A) exprimiert, die die Transkription der verzögerten frühen Gene E1B, E2A, E2B, E3 und E4 aktiviert (Schaak und Shenk, 1989). Anschließend werden die Transkriptionseinheiten (E2 – E4) transkribiert, die jeweils unter der Kontrolle eigener Promotoren stehen (Persson und Philipson, 1982).

Die Genregionen E1B, E2 und E4 kodieren für regulatorische Proteine. Das E1B-Protein bindet an E1A. Durch diese Bindung wird die frühe Genexpression und damit die Induktion von Apoptose vor Fertigstellung neuer Viruspartikel verhindert. Zugleich hemmt E1B den Abbau der viralen und zellulären DNA (Günzburg und Salomons, 1997).

Die Genprodukte der E2- und E4-Region sind für die virale Replikation verantwortlich, wobei die Proteine der E4-Region auch an der Fertigstellung der Virionen beteiligt sind (Günzburg und Salomons, 1997).

In der späten Phase reguliert der starke späte „major late promoter“ (MLP) Transkripte, die für Strukturproteine kodieren. Diese werden in fünf Gruppen unterteilt (L1 – L5) und sind sowohl für den Zusammenbau des Cores und des Capsids verantwortlich (Shenk, 1996).

## 1.4 Die Region E1A

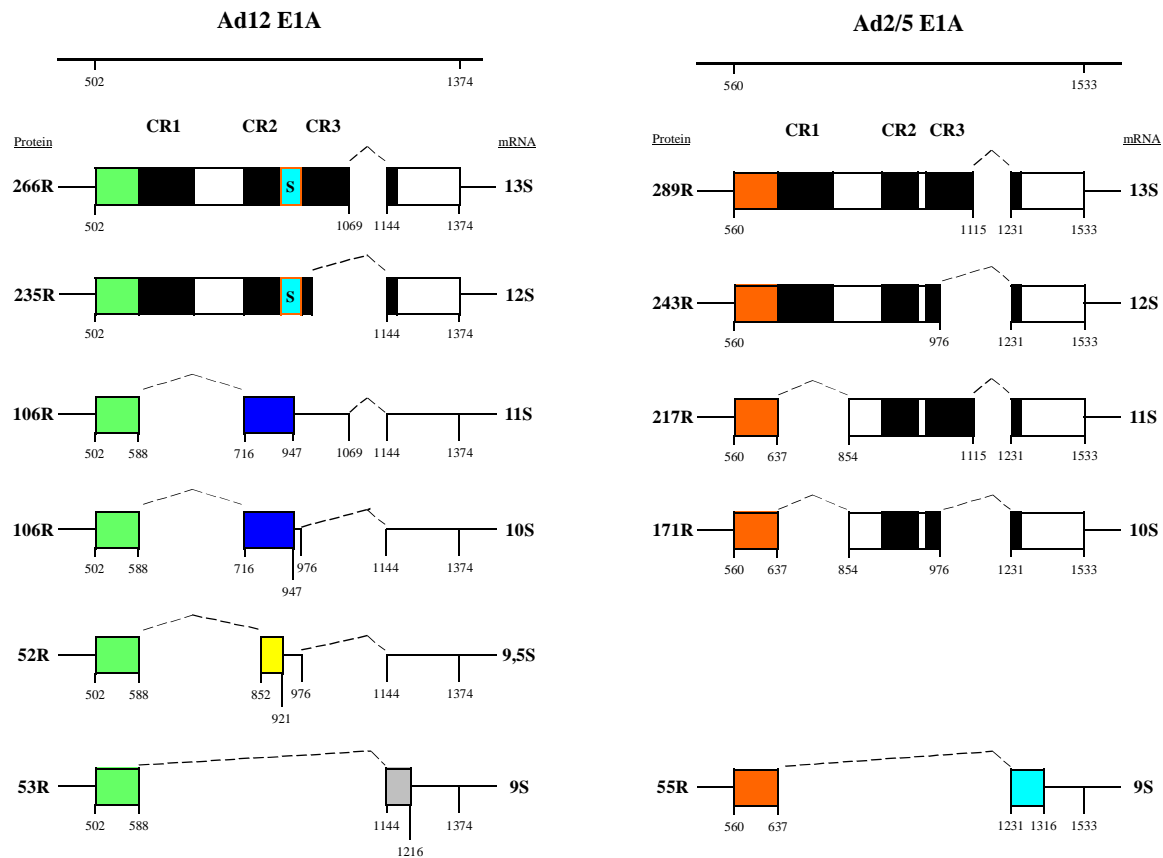
Am linken Genomende befindet sich die Region E1A. Das E1A-Gen der humanen Adenoviren wird sofort nach der Infektion exprimiert, und seine Genprodukte sind in der Lage, die Transkription sowohl von viralen als auch von zellulären Genen zu aktivieren und zu supprimieren (Nevins, 1990; Gallimore und Turnell, 2001). E1A-Proteine binden nicht selbst an DNA, sie kontrollieren aber die Zellproliferation und

die Transformation durch die Veränderung der Genexpression über die Interaktion mit verschiedenen zellulären Proteinen (Ferguson *et al.*, 1985).

Die Genprodukte von E1A sind extrem hitzebeständig (Krippel *et al.*, 1984) und tragen viele Prolinreste, die die Ausbildung großräumiger Sekundärstrukturen limitieren (Frisch und Mymryk, 2002).

Durch alternatives Spleißen kodiert das E1A-Gen bei Ad12 sechs und bei Ad2/5 fünf unterschiedliche mRNAs, die nach ihren Sedimentationskoeffizienten bezeichnet werden (Abb. 2). Die beiden Haupttranskripte, die 13S- und die 12S-mRNAs, kodieren für zugehörige Polypeptide mit 289 und 243 Aminosäureresten (R) für Ad2/5 und mit 266R und 235R für Ad12. Weiterhin entstehen noch kleinere Gen-Produkte, die 11S-, die 10S-, die 9S- und die 9,5S-mRNA, wobei letztere nur für Ad12 E1A spezifisch ist (Brockmann *et al.*, 1990).

Die beiden Haupttranskripte tragen zwei konservierte Regionen (CR), die CR1 und die CR2, die homolog sind zwischen den verschiedenen Adenovirus-Serotypen. Das 289R-Protein trägt eine weitere CR, die CR3, die eine transkriptionelle Aktivierungsdomäne enthält (Lillie und Green, 1989). Der im Exon 2 lokalisierte Carboxyterminus ist ebenfalls eine Region mit Homologie zwischen den von der 13S-mRNA exprimierten E1A-Proteinen von Ad12 und Ad5. Dort befindet sich die Kernlokalisationssequenz der großen E1A-Genprodukte (Lyons *et al.*, 1987). Darüber hinaus kommen Regionen ohne Homologie oder mit nur sehr geringer Homologie vor, wie der Aminoterminus (AS 1 – 29), mit Funktionen, die entweder für alle Serotypen gleich oder aber spezifisch für einzelne Serotypen sind. Weiterhin gibt es spezifische Ad5 E1A- und Ad12 E1A-Regionen, wie zwei Regionen, die spezifisch für Ad5 E1A sind. Dies sind die partiell austauschbaren Bereiche AR („Auxilliary Region“) 1 und AR2. AR1 ist notwendig für die CR3-vermittelte Transaktivierung verschiedener Gene (z.B. E4 und *hsp* [„heat shock protein“] 70 (Ström *et al.*, 1998). Für Ad12 E1A ist eine besondere Region zwischen der CR2 und der CR3, die sich in zwei Teilbereiche gliedert, essentiell. Diese Region wird als „Spacer“ bezeichnet und ist für onkogene Adenoviren spezifisch.



**Abb. 2: mRNAs der hoch-onkogenen Ad12 E1As und der nicht-onkogenen Ad2 bzw. Ad5 E1As.** Die Rechtecke stellen die von den verschiedenen mRNAs translatierten Proteine dar. 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 Nukleotide im adenoviralen Genom an. Sie bezeichnen die Lage des gemeinsamen Startkodons, der Spleißstellen und des Stopkodons. Die farbigen Rechtecke weisen auf unterschiedliche Leseraster innerhalb des Serotyps hin. (R) Aminosäurerest; (S) Svedberg-Einheit (nach Brockmann und Esche, 1995).

### 1.4.1 Einfluss von E1A auf die Transkription viraler und zellulärer Gene

Die Funktion der Genprodukte von E1A ist die Rolle bei der Virusreplikation und der damit verbundenen direkten oder indirekten Modulation der viralen und zellulären Genexpression.

Es konnte gezeigt werden, dass die CR3 alleine die Transkription von Zielgenen aktivieren kann (Lilli *et al.*, 1987). Die CR3 besteht aus zwei funktionell unterschiedlichen Domänen, dabei interagiert der C-terminale Bereich (Aminosäurereste 183-188) mit Transkriptionsfaktoren, wie ATF-2, CBF (CCAAT-binding factor) oder RAR-β (Pei und Berk, 1989). Der N-Terminus (Aminosäurereste

141-178) enthält eine Cys2His2-Zink-Finger-Domäne, die mit humanem Sur-2 interagiert (Boyer *et al.*, 1999). Der N-Terminus und die CR1 sind bei der transkriptionellen Repression von Genen durch E1A-Genprodukte von entscheidender Bedeutung (Jelsma *et al.*, 1989). Außerdem interagieren diese beiden Regionen der E1A-Proteine mit p300/CBP, was die Dissoziation von den Promotor-Komplexen bewirkt (Chen *et al.*, 1997).

Zielgene der AP-1-Transkriptionsfaktorfamilie werden ebenfalls durch E1A-Genprodukte aktiviert. Die Proteine der ATF- und CREB-Familie besitzen eine bZIP-Domäne, durch die sie Homo- oder Heterodimere mit AP-1/ATF/CREB-Familienmitgliedern bilden. Der *c-jun*-Promotor wird über die Interaktion von ATF-2 mit dem E1A-Protein aktiviert. Durch die gleichzeitige Änderung der Konformation von ATF-2 wird die aminoternale Transaktivierungsdomäne phosphoryliert (Sano *et al.*, 1998). Diese Aktivierungsfunktion der E1A-Proteine wird über die Interaktion des N-Terminus und der CR1 mit den Kofaktoren p300/CBP vermittelt (Duyndam *et al.*, 1999).

CtBP interagiert mit einer Region des Exon 2 der E1A-Genprodukte (Abb. 3). Diese Region mit den Aminosäureresten PLDLS gilt als konserviert unter den unterschiedlichen Adenovirus-Serotypen (Schaeper *et al.*, 1995).

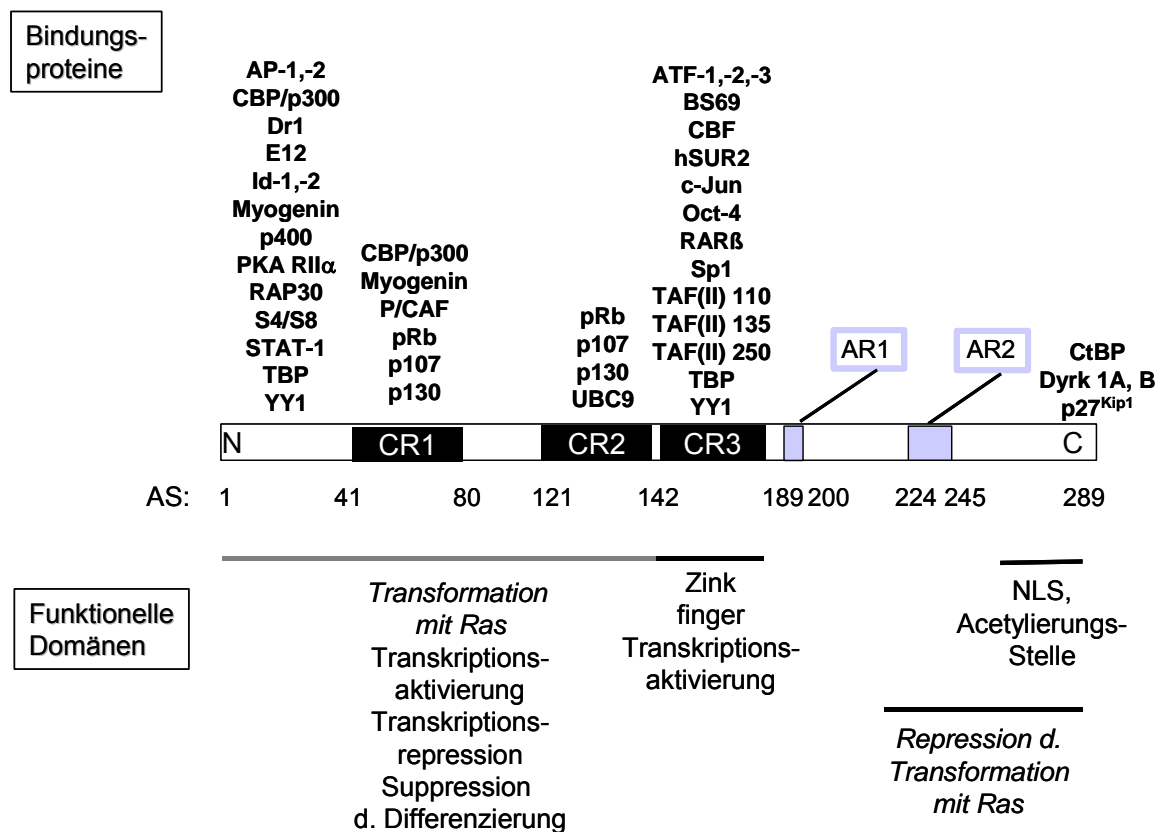
Die Funktion der Transaktivierung durch den Transkriptionsfaktor AP-2 wird in Bezug auf das MMP-2-Gen durch die direkte Bindung von AP-2 an das Ad5 12 E1A-Protein inhibiert. Dabei ist die Bindung von p300 an den N-Terminus von E1A essentiell (Somasundaram *et al.*, 1996).

Weiterhin stellen die CR1 und die CR2 wichtige Regionen für die Transkriptionsaktivierung dar. Die Freisetzung von Mitgliedern der E2F-Familie aus dem Komplex mit pRb und weiteren Pocketproteinen, wie p107 und p130, wird durch E1A-Genprodukte vermittelt (Wang *et al.*, 1991). E1A-Proteine binden über die CR2 an die Pocketproteine und mimikrieren so deren Phosphorylierung durch Cyclin-abhängige Kinasen, wie CycD/cdc4/6. Deshalb werden E2F-Faktoren freigesetzt, die daraufhin die Transkription ihrer Zielgene, wie DHFR, DNA-Polymerase  $\alpha$ , PCNA oder Cyclin A, aktivieren (Slansky und Farnham, 1996).

Die Genprodukte von E1A interagieren mit TBP, YY1 und dem Tumorsuppressorprotein p105-RB. Über diese Ko-Faktoren interagieren die E1A-Proteine mit Genen, deren Genprodukte wichtige Elemente des Zellzyklus darstellen. Beispiele für ein anderes wichtiges Protein, das an das E1A-Genprodukt bindet, ist

das TATA-bindende Protein (Abraham *et al.*, 1993; Moran, 1993; Arany *et al.*, 1995; Lundblad *et al.*, 1995). Die Bindung an diese Proteine ist essentiell für viele Funktionen der E1A-Proteine, wie die der Transformation (Moran *et al.*, 1986; Lillie *et al.*, 1987; Schneider *et al.*, 1987; Whyte *et al.*, 1988; Gallimore und Turnell, 2001). Es wird angenommen, dass die Transkriptionsregulation der E1A-Proteine durch eine Veränderung der HAT (Histonacetyltransferase)-Aktivität von Kofaktoren wie p300/CBP oder pCAF erzielt wird (Gallimore und Turnell, 2001). Die Acetylierung von Histonen ist zum einen notwendig für die Aufhebung transkriptionsreprimierender Strukturen des Chromatins und zum anderen aktiviert sie die RNA-Polymerase II-abhängige Transkription (Struhl, 1998).

Die meisten zellulären Faktoren, die mit den E1A-Proteinen interagieren sind zentrale Regulatoren der Zellproliferation und der Apoptose.



**Abb. 3: Darstellung der Interaktion des 289 Aminosäuren (R) großen Proteins von Ad2/5 E1A mit zellulären Proteinen und seinen Funktionen.** Das Protein Ad2/5 E1A 289R ist als Rechteck dargestellt. Die konservierten Regionen CR1 – CR3 sind schwarz ausgefüllt. Regionen, die funktionelle Domänen der E1A-Proteine repräsentieren, sind unter den Linien beschriftet. Die zellulären Faktoren, die für die physikalische Interaktion mit den E1A-Proteinen von essentieller Bedeutung sind, sind über der Darstellung jeweils über den für die Interaktion spezifischen Regionen angegeben (modifiziert nach Bayley und Mymryk, 1994).

### 1.4.2 Koexpression von E1A-Proteinen mit einem Apoptoseinhibitor

Neben der regulierenden Funktion während der viralen Infektion, die hauptsächlich durch das 289R-Protein ausgeübt wird, besitzt auch das 243R-Protein alle Funktionen, die für die Transformation primärer Nagetierzellen notwendig sind, in Kooperation mit anderen viralen oder zellulären Onkogenen (Graham *et al.*, 1974; Houweling *et al.*, 1980; Ruley, 1983; Zerler *et al.*, 1986). Die Modulation der zellulären Genexpression durch E1A-Proteine ist ebenso notwendig für die Transformation primärer Nagetierzellen. Die E1A-Genprodukte ermöglichen die Veränderung des Zellzyklus durch Bindung an und Störung von wichtigen Regulatoren des Zellwachstums, wie das Retinoblastom-Protein pRb und der transkriptionelle Koaktivator p300 (White, 2001). Apoptose ist die Verteidigung einer infizierten Zelle gegenüber massiven Störungen innerhalb der Regulation des Zellwachstums, die durch die E1A-Proteine während der Virusinfektion und Transformation verursacht wurden. Für das Überleben des Virus ist die Induktion von Apoptose durch die E1A-Genprodukte kontraproduktiv und erfordert daher die Koexpression von E1A-Proteinen zusammen mit einem Apoptoseinhibitor. Diese proapoptotischen Funktionen der E1A-Genprodukte werden durch die Expression der E1B-Proteine außer Kraft gesetzt und die produktive Infektion und Transformation wird darum aufrechterhalten (White, 2001).

Zu diesem Zweck kodiert E1B für zwei Proteine, ein 55 kDa und ein 19 kDa großes Protein, die beide entweder ganz oder teilweise als Apoptoseinhibitor fungieren (White, 1995). Das E1B-Protein mit einer Größe von 55 kDa bindet an p53 und inhibiert dessen Funktion als Tumorsuppressorprotein. p53 inhibiert die Progression des Zellzyklus und induziert Apoptose (Levine, 1997). Das 19 kDa große E1B-Protein ist ein antiapoptotisches adenovirales Bcl-2-Homolog. Bcl-2 ist ein prototypisches Mitglied einer Familie von Proteinen, die Apoptose regulieren (Gross *et al.*, 1999). Jedoch gibt es auch Mitglieder der Bcl-2-Familie, die antiapoptotische Funktionen besitzen. Diese Bcl-2-Proteine fördern das Überleben der Zelle und die Onkogenese, wohingegen proapoptotische Bcl-2-Familienmitglieder für die Induktion von Apoptose benötigt werden. Die Homologie zwischen dem E1B-Protein mit einer Größe von 19 kDa und Bcl-2 beinhaltet direkte Sequenzhomologie, funktionelle Austauschbarkeit

als Apoptoseinhibitoren und die Interaktion mit einigen der gleichen intrazellulären Proteinen, so dass hier eine verwandte biochemische Funktion vermutet werden kann. Das 19 kDa große E1B-Protein blockiert Apoptose, die durch die E1A-Proteine innerhalb der produktiven Infektion induziert werden.

## 1.5 Tumorsuppression durch E1A

Im Gegensatz zu den Beobachtungen in Nagerzellen konnte den E1A-Genprodukten eine Tumorsuppressoraktivität in einer Vielzahl von menschlichen Tumorzellen nachgewiesen werden, einschließlich der Suppression der Metastasierung und der Sensibilisierung der Zellen gegenüber Zytostatika und ionisierender Strahlung (Frisch, 1991; Chinnadurai, 1992; Mymryk, 1996). Diese Funktion entspringt teilweise aus der Suppression von HER-2/neu in neoplastischen Zellen, die dieses Onkogen überexprimieren. Die Tumorsuppression durch E1A-Proteine kann aber auch in Zellen aktiviert werden, die HER-2/neu nicht überexprimieren (Frisch und Dolter, 1995; Frisch und Mymryk, 2002). Die Tumorsuppression durch E1A-Genprodukte wird teilweise durch Sequenzen des Exon 2 vermittelt, die die *in vitro* Transformation, die Tumorgenese und die Metastasierung negativ beeinflussen können (Schaeper *et al.*, 1995).

Die Veränderung der Phosphorylierung und damit der Aktivierung der Akt/PKB-Kinase wurde als Schlüsselmechanismus der E1A-vermittelten Revertierung der Malignität vorgeschlagen, und Sequenzen des Exon 1 wurden für die Funktion als notwendig beschrieben (Liao und Hung, 2003).

Eine weitere wichtige antineoplastische Eigenschaft der E1A-Genprodukte ist die bereits oben erwähnte Suppression der Expression metastasefördernder oder die Aktivierung der Expression metastasereprimierender Proteine. Metastasierende Tumorzellen exprimieren Metalloproteasen, die die Matrix abbauen, in hohen Mengen. Die Stärke der Expression korreliert mit dem metastasierenden Potential der Zelle (Somasundaram *et al.*, 1996). Die Expression der Matrix-Metalloprotease-2 (MMP-2) wird durch E1A-Proteine supprimiert, was mit der Fähigkeit der E1A-Genprodukte korreliert, an den *MMP-2*-transaktivierenden Transkriptionsfaktor AP-2

zu binden, wobei die DNA-Bindungs- und die Dimerisierungsregion das Ziel der E1A-Interaktion sind (Somasundaram *et al.*, 1996). Die Region, mit der E1A-Proteine an AP-2 binden, befindet sich am Aminoterminus, und der Bereich wurde ungefähr auf die Aminosäuren (AS) 2 – 36 bestimmt. Die Bindungsfähigkeit von E1A-Proteinen an p300 scheint für die Suppression von MMP-2 nicht notwendig zu sein, obwohl auch diese Bindung über den Aminoterminus von E1A erfolgt. Eine Ad5-E1A-Punktmutante, die nicht mehr in der Lage war p300 zu binden, konnte die MMP-2-Expression effizient supprimieren (Somasundaram *et al.*, 1996).

Für die antimetastatische Aktivität in humanen Tumorzellen durch E1A-Proteine ist die Regulation der Expression weiterer metastaseassoziiierter Gene, wie E-Cadherin oder HER-2/neu, durch E1A-Genprodukte wesentlich. Die Expression dieser Gene wird entweder auch von AP-2 reguliert, oder es befinden sich zumindest Bindungsstellen für diese Transkriptionsfaktoren in den Promotoren der Zielgene (Mymryk, 1996).

Die Expressionsregulation metastaserelevanter Gene könnte auch durch die Bindung von E1A-Proteinen an den Transkriptions-Korepressor CtBP bedingt sein. E1A-Mutanten, denen die CtBP-Interaktionsdomäne fehlt, können zusammen mit Ras eine Zelltransformation mit deutlich erhöhtem Metastase-Potential der transformierten Zellen induzieren (Subramanian, 1998). CtBP ist ein Korepressor und wird von dem Zink-Finger-Protein „Krüppel“ verwandten Faktor AP-2rep/KLF12 rekrutiert, um die Expression von AP-2 $\alpha$  zu supprimieren. E1A-Genprodukte aktivieren die AP-2-Expression durch das Abfangen von CtBP (Schuierer *et al.*, 2001). Zusätzlich trägt der AP-2-Promotor ein transaktivierendes Oktamer-Element, welches den Transkriptionsfaktor Oct-1 (OTF-1, NFIII) bindet (Creaser *et al.*, 1996). E1A-Proteine können die Bindung von Oct-1 verstärken und die Transkription über die Oktamer-Bindungsstelle aktivieren (Chellappan und Nevins, 1990).

### **1.5.1 Induktion von Apoptose durch E1A**

Für die Apoptoseinduktion durch das Produkt der E1A 12S-mRNA werden in normalen Rattenfibroblasten (NRK-Zellen) die gleichen E1A-Regionen benötigt, die

auch die Progression des Zellzyklus fördern (Mymryk *et al.*, 1994). Andererseits ist das Produkt von E1A 12S-mRNA nur in der Lage, in Zellen Apoptose zu induzieren, die proliferationsinhibiert sind. Die Expression der E1A-Genprodukte supprimiert den Proteasomen/Ubiquitin-Abbauweg und führt folglich zur Stabilisierung des p53-Proteins (Nakajima *et al.*, 1998). Das E1A 289R-Protein ist auch in der Lage, unabhängig von p53 Apoptose zu induzieren. Es wird angenommen, dass das Protein, das von E1A 13S-mRNA translatiert wird, an der Prozessierung und Aktivierung der Caspase-3 beteiligt ist. Caspase-3 spaltet und inaktiviert in ihrer Funktion als aktive Protease die Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP). Die PARP-Spaltung tritt als eines der ersten Ereignisse während der Apoptose auf (Boulakia *et al.*, 1996).

Die Produkte von E1A aktivieren nicht nur die Caspase-3, sondern auch noch weitere Mitglieder der Caspasefamilie. Die Auslösung der Apoptose geht mit der Aktivierung der Caspase-Kaskade einher, die über zwei verschiedene Mechanismen abläuft (Guo und Hay, 1999). Die Bindung eines Liganden an den Zelloberflächenrezeptor APO-1 (Fas/CD95), ein Mitglied der TNFR-Familie, induziert Apoptose durch die Oligomerisierung des Rezeptors (Kischkel *et al.*, 1995). Die Procaspase-8 oder -10 bindet mit Hilfe des Adaptermoleküls FADD an den Rezeptor und wird dann durch autokatalytische Prozessierung aktiviert (Kischkel *et al.*, 1995; Muzio *et al.*, 1998). Das E1A 12S-Produkt aktiviert die Prozessierung der Caspase-8. Allerdings ist die Induktion der Prozessierung unabhängig von der Interaktion mit FADD (Nguyen *et al.*, 1998). Über einen weiteren Signaltransduktionsweg wird Cytochrom c aus den Mitochondrien abgesondert. Cytochrom c induziert gemeinsam mit dem Kofaktor Apaf-1 die Caspase-9 (Fearnhead *et al.*, 1998). Die Genprodukte von E1A sind an der Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und an der Induktion von Apaf-1 und Caspase-9 beteiligt, die unabhängig von der Ausschüttung des Cytochrom c ist (Fearnhead *et al.*, 1998).

Ein weiterer Weg, wie E1A-Proteine in Zellen Apoptose induzieren können, geschieht über die Sensibilisierung der Zellen gegenüber TNF- $\alpha$ -induzierter Apoptose. Dazu wird die I $\kappa$ B-Kinase durch E1A-Proteine supprimiert und gleichzeitig erfolgt die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$ . Dies führt zu der Inhibierung von NF- $\kappa$ B-Aktivitäten (Shao *et al.*, 1999) und durch die Suppression von NF- $\kappa$ B durch E1A-Genprodukte wird Apoptose induziert. Für diese Funktion werden die p105-Rb und die p300-bindenden Regionen von E1A benötigt.

## 1.6 Sensibilisierung von Tumorzellen gegenüber Strahlen und Zytostatika durch E1A-Proteine

E1A-Proteine sind in der Lage, unterschiedliche Tumorzelllinien gegenüber der Behandlung mit Strahlen oder verschiedener Chemotherapeutika, wie 5-Fluoruracil, Etoposid, Adriamycin, Cisplatin, Doxorubicin und Cyclophosphamid zu sensibilisieren (Kido *et al.*, 1991; Lowe *et al.*, 1993B; Frisch und Dolter, 1995; Sánchez-Prieto *et al.*, 1995; Shao *et al.*, 1997). Dabei ist die Sensibilisierung der neoplastischen Zellen gegenüber Zytostatika von der Apoptoseinduktion durch E1A-Genprodukte abhängig. Viele apoptotische Stimulanzen, einschließlich dem Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), ionisierender Strahlung und verschiedener Chemotherapeutika aktivieren NF- $\kappa$ B, ein Transkriptionsfaktor, der viele Gene, wie Immunrezeptoren, Zytokine und Viren reguliert. NF- $\kappa$ B hat eine anti-apoptotische Rolle und blockiert Apoptose, die durch TNF- $\alpha$ , ionisierende Strahlung oder dem chemotherapeutischen Agens Daunorubicin induziert wird. Die Inaktivierung von NF- $\kappa$ B ist ein wichtiger Faktor für die E1A-vermittelte Sensibilisierung von Tumorzellen gegenüber Apoptose, die durch Strahlung induziert wird.

Weiterhin wird zum einen p53 aktiviert und zum anderen sind die Genprodukte von E1A in der Lage, p53-Nullzellen für die Behandlung mit DNA-schädigenden Substanzen zu sensibilisieren (Lowe *et al.*, 1993B; Frisch und Dolter, 1995).

Die Regionen der E1A-Produkte, die für die Sensibilisierung gegenüber Zytostatika notwendig sind, sind für die verschiedenen Substanzen unterschiedlich. In Bezug auf Cyclophosphamid gibt es bisher keine Untersuchungen des Einflusses von E1A-Proteinen auf die mit Cyclophosphamid behandelten Zellen. Cyclophosphamid ist genauso wie Cisplatin ein alkylierendes Zytostatikum. Für Cisplatin ist bekannt, dass die CR1 und CR2 für die Sensibilisierung wichtig sind (Sánchez-Prieto *et al.*, 1995).

## 1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Auf der Basis seiner antitumorigenen Funktionen *in vitro* und in Tiermodellen haben E1A-Genprodukte bereits ihren Weg in klinische Studien für HER-2/neu-überexprimierende Ovarial- und Mammakarzinome wie auch für Kopf- und Halstumore gefunden (Hortobagyi *et al.*, 2001; Villaret *et al.*, 2002; Madhusudan *et al.*, 2004). Diese Studien zeigten die Sicherheit und die Verträglichkeit einer Genterapie mit Plasmid-DNA-Komplexen, die E1A-Proteine von einer genomischen DNA exprimieren. In Patienten mit Kopf- und Halstumoren konnte eine geringfügige Tumorreduktion beobachtet werden (Villaret *et al.*, 2002). Darin begründet liegt die Rechtfertigung für weitere Untersuchungen in Bezug auf E1A als therapeutisches Transgen.

Um die Sicherheit von E1A für die klinische Anwendung weiter zu verbessern, wurde die Tumorsuppressoraktivität von E1A-Deletionsmutanten überprüft, die sich als transformationsdefekt in Melanomzellen erwiesen. Dabei konnte gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist, die transformierenden von den supprimierenden Eigenschaften zu trennen (Dickopp *et al.*, 2000). Eine transformationsdefekte Mutante von E1A, Spm2, die von Ad12 abstammt (Rumpf *et al.*, 1999), hat sich ebenfalls als möglicher Tumorsuppressor herausgestellt (Kirch *et al.*, persönliche Mitteilung).

Basierend auf diesen Ergebnissen und der Tatsache, dass E1A-Genprodukte andere virale Promotoren sowohl positiv, wie bsp. den CMV-Promotor (Metcalf *et al.*, 1994) als auch negativ, wie bsp. den SV40-Promotor (Velcich und Ziff, 1985) oder den HIV-1 LTR (Song *et al.*, 1995; Tsang *et al.*, 1996) regulieren kann, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob E1A-Genprodukte in der Lage sind die Transkription des LANAp zu regulieren.

Mit dem Ziel, möglicherweise Apoptose in den HHV-8-positiven Zellen zu induzieren, sollte zunächst geprüft werden, ob der LANAp durch E1A supprimiert wird. Aus methodischen Gründen wurden die Experimente zunächst in Melanomzellen

durchgeführt. Anschließend wurde die Regulation des LANAp durch E1A aber auch in der HHV-8-positiven Zelllinie BC-3 überprüft.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob E1A in der Lage ist Apoptose in den HHV-8-positiven Zellen zu induzieren und ob E1A diese Zellen für die Behandlung mit einem Chemotherapeutikum sensibilisieren kann.

## 2 Material

Die hier nicht aufgeführten Chemikalien und andere Materialien wurden in p. A. Qualität von den Firmen Sigma-Aldrich, Merck oder Roche Diagnostics bezogen.

### 2.1 Chemikalien

Die aufgeführten Chemikalien hatten p.A. Qualität.

Acetyl-CoA (Coenzym A)	Roche Diagnostics, Mannheim
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Ampicillin (Binotal)	Bayer, Leverkusen
ATP	Roche Diagnostics, Mannheim
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Sigma-Aldrich, München
Coenzym A	Sigma-Aldrich, München
Desoxynukleotide	Roche Diagnostics, Mannheim
DTT	Sigma-Aldrich, München
EDTA	Sigma-Aldrich, München
EGTA	Sigma-Aldrich, München
Ethanol	J. T. Baker Inc., Phillipsburg, New Jersey, USA
Ethidiumbromid	Roche Diagnostics, Mannheim
Gelatine	Merck, Darmstadt
Glycerin	Fluka, Neu-Ulm
Glycinglycin	Merck, Darmstadt
Glycogen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Isopropanol	J. T. Baker Inc., Phillipsburg, New Jersey, USA
JetPei	Qbiogene, Heidelberg
LB-Agar	Invitrogen, Karlsruhe

LB-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Luciferin	Biotrend Chemikalien, Köln
Magnesiumcarbonat	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Methanol	J. T. Baker Inc.; Philipsburg, New Jersey, USA
Mineralöl	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
PEG6000	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
PMSF	Sigma-Aldrich, München
SDS	BioRad, München
Tricin	Sigma-Aldrich, München
Tris	Sigma-Aldrich, München
Tween-20	Sigma-Aldrich, München

## 2.2 Kits

ECL Advance Western Blotting Detection Kit	Amersham	Biosciences,
	Freiburg	
NucleoBond PC 500 EF	Macherey-Nagel	GmbH &
	Co.KG, Düren	
Omniscript Reverse Transcriptase	Qiagen, Hilden	
QIAEXII Gel Extraction-Kit	Qiagen, Hilden	
QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Amsterdam	

## 2.3 Enzyme, Enzypuffer und Proteine

Aprotinin (Rinderlunge, 4 TIU/mg)	Sigma-Aldrich, München
Hot Start Taq Polymerase (5 U/µl)	Invitrogen, Karlsruhe
5x Ligationspuffer	Invitrogen, Karlsruhe

Leupeptin	Sigma-Aldrich, München
MgCl <sub>2</sub>	Invitrogen, Karlsruhe
10x PCR-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsenzyme (10 – 50 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe Roche Diagnostics, Mannheim
Trypsin/EDTA (Rinderpankreas)	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA Ligase (1 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.4 Antikörper

Anti-E1A monoklonaler Maus-IgG-Antikörper (M73, Best. Nr. sc-25)	Santa Cruz Biochemicals, Heidelberg
Anti-Maus IgG-Antikörper Peroxidase konjugiert	Calbiochem, Heidelberg

## 2.5 Nukleinsäuren

Humane Plazenta-DNA	Sigma-Aldrich, München
---------------------	------------------------

## 2.6 Vektoren

pCR2.1	Klonierungsvektor, Invitrogen, Karlsruhe
pGL3B	Luciferase-Reporter-Vektor, Promega, Mannheim
pGL3C	Luciferase-Kontrollvektor mit SV40-Promotor, Promega Mannheim
pLXSN	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
pRc/RSV	Eukaryontischer Expressionsvektor, Invitrogen, Karlsruhe

pVP22/myc-His Eukaryontischer Expressionsvektor, Invitrogen, Karlsruhe

## 2.7 Plasmide

pCR2.1-LNA-Mim-#8	Enthält 142 bp der viralen cDNA-Sequenz von LANA (ORF 73) von HHV-8 (zur Verfügung gestellt von O. Flore, New York University)
pGL3B-LANAp	Enthält den LANAp (Nukleotidpositionen -774 - + 30, zur Verfügung gestellt von Y. Chang, Columbia University, New York, USA)
pGL3B-del -262	Enthält den LANAp (Nukleotidpositionen -262 - + 30, zur Verfügung gestellt von Y. Chang, Columbia University, New York, USA)
pGL3B-del -67	Enthält den LANAp (Nukleotidpositionen -67 - + 30, zur Verfügung gestellt von Y. Chang, Columbia University, New York, USA)
pGL3B-del -59	Enthält den LANAp (Nukleotidpositionen -59 - + 30)
pGL3B-del -59SP1	Enthält den LANAp (Nukleotidpositionen -59 - + 30, Nukleotidpositionen -15 - -10 deletiert)
pGL3B-del -653-AP-2	Enthält den Promotor des Transkriptionsfaktors AP-2 (Nukleotidpositionen -653 - -4)
pGL3B-hTERT	Enthält den Promotor des <i>hTERT</i> -Gens (Nukleotidpositionen -1665 - +5, zur Verfügung gestellt von I. Horikawa und J.C. Barrett, National Institute of Environmental Health Science, North Carolina, USA)
pLXSN-LANA	Enthält die cDNA des latenten Antigens LANA (ORF 73) von HHV-8 (zur Verfügung gestellt von O. Flore, New York University)
pLXSN-latente-Gene	Enthält cDNAs der latenten Antigene vCyclin (ORF72), vFLIP (ORFK13/ORF71) und LANA (ORF 73)

pRc/RSVAd213S	Enthält die cDNA generiert von der E1A 13S-mRNA von Ad2 (zur Verfügung gestellt von H.-C. Kirch, Innere Klinik/Tumorforschung, Essen)
pRc/RSVAd212S	Enthält die cDNA generiert von der E1A 12S-mRNA von Ad2 (zur Verfügung gestellt von H.-C. Kirch, Innere Klinik/Tumorforschung, Essen)
pRc/RSVAd513S	Enthält die cDNA generiert von der E1A 13S-mRNA von Ad5 (Dickopp <i>et al.</i> , 2000)
pRc/RSVdeICR2	Enthält die cDNA generiert von der E1A 13S-mRNA von Ad5 mit einer Deletion der konservierten Region 2 (Dickopp <i>et al.</i> , 2000)
pRc/RSVCR3EX2	Enthält die cDNA der konservierte Region 3 und Exon 2 generiert von der E1A 13S-mRNA von Ad5 (Dickopp <i>et al.</i> , 2000)
pRc/RSVEx2	Enthält die cDNA des Exons 2 generiert von der E1A 13S-mRNA von Ad5 (Dickopp <i>et al.</i> , 2000)
pRc/RSVAd1213S	Enthält die cDNA generiert von der E1A 13S-mRNA von Ad12 (Dickopp <i>et al.</i> , 2000)
pRc/RSVSpex	Enthält die cDNA generiert von der E1A 13S-mRNA von Ad12 mit der Spacer-Region, in der sechs Alanine deletiert wurden, die konservierte Region 3 und Exon 2 (Kirch <i>et al.</i> , 2002)
pRc/RSVAd1212S	Enthält die cDNA generiert von der E1A 12S-mRNA von Ad12 (Dickopp <i>et al.</i> , 2000)
pUHC13-3-SP72-Hsp70	Enthält den minimalen <i>Hsp70</i> -Gen-Promotor (zur Verfügung gestellt von C. Svensson, Universität Upsala Schweden)
pVP22Spm2	Enthält die cDNA generiert von der E1A 13S-mRNA mit einer Deletion von sechs Alaninen im Spacer und wird von dem humanen TERT-Promotor kontrolliert (Kirch <i>et al.</i> , 2002)

Die E1A-Plasmide pVP22Spm2, pRc/RSVSpex, pRc/RSVAd1213S, pRc/RSVAd1212S, pRc/RSVAd213S, pRc/RSVAd212S, pRc/RSVAd513S,

pRc/RSVdelCR2, pRc/RSVCR3EX2, pRc/RSVEx2 wurden freundlicherweise von PD Dr. H.-C. Kirch (Innere Klinik/ Tumorforschung, Essen) zur Verfügung gestellt (Kirch *et al.*, 2002, Dickkopp *et al.*, 2000). Die nachfolgende Nennung der Plasmide erfolgt ohne die Vektorbezeichnung.

## 2.8 Molekulargewichtstandards (Protein/DNA)

MassRuler DNA Ladder, Mix, ready-to-use      Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

SeeBlue Plus2 Marker      Invitrogen GmbH, Karlsruhe

## 2.9 Bakterienstämme (*E.coli*)

DH5 $\alpha$  *SupE44*  $\Delta$ *lacU169* ( $\Phi$ 80*lacZ*  $\Delta$ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*  
(Invitrogen, Karlsruhe)

## 2.10 Zelllinien

HEK293      Humane embryonale Nierenzelllinie mit Ad5E1A und E1B transformiert, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA (Graham *et al.*, 1977)

BC-3      Humane mit HHV-8 infizierte B-Zelllinie, zur Verfügung gestellt von Ornella Flore, New York University Medical School, USA (Arvanitakis *et al.*, 1996).

BLM      Humane Melanomzelllinie, zur Verfügung gestellt von Guido Swart, Universität Nijmegen, Niederlande (van Muijen *et al.*, 1991)

HeLa-tk	Humane epitheloide Cervix-Karzinomzelllinie, zur Verfügung gestellt von Helmut Esche, Klinikum der Universität Duisburg-Essen (Gey <i>et al.</i> , 1952)
HUVEC	Zellen humaner Nabelvenen (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), zur Verfügung gestellt von Ornella Flore, New York University Medical School, USA (Hoshi und McKeehan, 1984)
H460	Humane großzellige Lungenkarzinom Zelllinie, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA (Banks-Schlegel <i>et al.</i> , 1985; Takahashi <i>et al.</i> , 1989)
H1299	Humane nicht-kleinzellige Lungenkarzinom Zelllinie, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA (Gazdar <i>et al.</i> , 1990; Takahashi <i>et al.</i> , 1992)
KS2616	Humane mit HHV-8 infizierte Zelllinie hergestellt aus der Läsion eines HIV-negativen KS-Patienten, zur Verfügung gestellt von Ornella Flore, New York University Medical School, USA (Curreli <i>et al.</i> , 2005)
MV3	Humane Melanomzelllinie, zur Verfügung gestellt von Guido Swart, Universität Nijmegen, Niederlande (van Muijen <i>et al.</i> , 1991)
RPMI8226	Humane Plasmazytom/Myelom B-Zelllinie, zur Verfügung gestellt von Mohammad R. Nowroussian (Matsuoka <i>et al.</i> , 1967)

## 2.11 Zellkulturmaterialien

Cyclophosphamid	Baxter Oncology, Frankfurt
DMEM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DMSO	Riedel-de-Haen, Seelze
Effectene Transfektionsreagenz	Qiagen GmbH, Hilden
FGF	Tebu-bio, Offenbach
Fötale Kälberserum	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Heparin	Sigma-Aldrich, München
JetPei <sup>TM</sup> Transfektionsreagenz	Qbiogene, Heidelberg
JetPeiRGD <sup>TM</sup> Transfektionsreagenz	Qbiogene, Heidelberg

L-Glutamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Lipofectamine2000	Invitrogen GmbH, Calsbad, Kalifornien, USA
M199	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin Lösung, flüssig (10,000 U/ml)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RPMI1640	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TPA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trypsin/EDTA	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
VEGF	Tebu-bio, Offenbach
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
„6-Well“-Zellkulturplatten	TPP über Renner GmbH, Dannstadt
Spinnerflasche	Belco Biotechnology, Vinland, New Jersey, USA
Zellkulturschalen, -flaschen, -platten	TPP über Renner GmbH, Dannstadt
„24-Well“-Zellkulturplatten	TPP über Renner GmbH, Dannstadt
„96-Well“-Zellkulturplatten	TPP über Renner GmbH, Dannstadt

## 2.12 Nährmedien und Zellkulturlösungen

DMEM (komplett)	10 % (v/v) FKS 5 ml L-Glutamin (100x) 5 ml Penicillin/Streptomycin Solution, liquid (10,000 U/ml) ad. 500 ml DMEM
M199 (komplett)	20 % (v/v) FKS 5 ml L-Glutamin (100x) 5 ml Penicillin/Streptomycin Solution, liquid (10,000 U/ml) 10 ng/ml VEGF („Vascular Endothelial Growth Factor“) 10 ng/ml FGF („Fibroblast Growth Factor“)

	1x Heparin
	ad. 500 ml M199
PBS <sup>-</sup>	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
PBS <sup>++</sup>	Wie PBS <sup>-</sup> , mit 0,4 mM MgSO <sub>4</sub> und 7 mM CaCl <sub>2</sub>
RPMI1640 (komplett)	20 % (v/v) FKS
	5 ml L-Glutamin (100x)
	5 ml Penicillin/Streptomycin Solution, liquid (10,000 U/ml)
	ad. 500 ml RPMI1640

Alle Nährlösungen wurden bei 4 °C gelagert und kurz vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt.

## 2.13 Verbrauchsmaterialien

Elektroporationsküvetten, 0,4 cm	BioRad, München
Invitrolon PVDF	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NuPage Bis-Tris-Gele 4 % - 12 %	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Sterilfilter	Millipore, Eschborn
Whatman-Filterpapier	Whatman, Maidstone, England

Alle nicht gesondert aufgeführten allgemeinen Verbrauchsgegenstände stammten von einer der genannten Firmen.

## 2.14 Spezielle Geräte

Bakterienschüttler G25

New Brunswick Scientific, Edison, USA

CO <sub>2</sub> Begasungsinubator	NuAire Inc., Plymouth, Massachusetts, USA
DNA-Trio-Thermoblock für die PCR	Biometra, Göttingen
Gene Pulser II	BioRad, München
Lightwave S2000 Spectrophotometer	WPA, Cambridge, UK
Luminometer	Berthold, Overrath
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München
Transilluminator (UV, 302 nm)	Bachhofer, Reutlingen
Xcell SureLock Mini-Cell	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

## 2.15 Verwendete Puffer und Lösungen

Hier nicht aufgeführte Puffer und Lösungen wurden dem Handbuch für molekularbiologische Methoden „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel *et al.*, 1997) entnommen.

Advanced Protein Assay Reagents	Cytoskeleton, Denver, Colorado, USA
Ampicillin-Lösung	50 mg/ml in A. bidest (Lagerung bei -20°C)
DNA-Probenpuffer (6 x)	150 mM EDTA 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF 30 % Glycerin
Glo Lysis Puffer	Promega, Mannheim
Luciferase-Assay-Reagenz:	20 mM Tricin 1,07 mM Mg-Carbonat 2,67 mM MgSO <sub>4</sub> 0,1 mM EDTA 33,3 mM DTT 270 µM CoEnzymA 530 µM ATP 470 µM Luciferin-Lösung

Luciferin-Lösung:	100 mM Luciferin 25 mM Glycinglycin 15 mM MgSO <sub>4</sub> 4 mM EDTA 2 mM DTT
MTT-Stammlösung	5 mg/ml in PBS
NuPage LDS-Probenpuffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NuPage Transfer Buffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RIPA-Puffer	1 M Tris-Cl, pH 7,2 5 M NaCl 20 % SDS 1 % Natriumdeoxycholate (w/v) 1 % Triton X 100 (v/v)
TAE-Puffer (50 x)	2 M Tris Base 1 M Na-Acetat 0,1 M EDTA, pH 7,4
TBS-Blockierungspuffer	1 x TBS 0,05 % Tween 20 5 % Magermilchpulver
TBS-Puffer	10 mM Tris-Cl, pH 8,0 150 mM NaCl

## 2.16 Oligonukleotide

Die im Verlauf von Polymerase-Kettenreaktionen eingesetzten Oligonukleotide sind in der folgenden Tabelle aufgeführt und wurden von der Firma MWG, Ebersberg, synthetisiert.

Die Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) der einzelnen Oligonukleotide wurden nach der Formel von Suggs *et al.*, 1981, berechnet:

$$T_m = [(A + T) * 2 \text{ °C}] + [(G + C) * 4 \text{ °C}]$$

Name	5' → 3'-Sequenz
AP-2-Prom-NheI-For	CTAGCTAGCGCAGGGTTAAGGGAGAAGTGCTAG
AP-2-Prom-HindIII- Rev	CCCAAGCTTCATGGATCGGCGTGAACGGATATG
HHV-8-1-D-KpnI-For	CGGGGTACCCCAATCAGAAAGTAGCTTGA
HHV-8-1-D-XhoI-Rev	CCGCTCGAGCTGCCTCCAAATGATACACA
HHV-8-1-D-SP1-For	CAATCAGAAAGTAGCTTGATATAACTTCCACTACGCGGCG CCCGGGAC
HHV-8-1-D-SP1-Rev	GTCCCGGGCGCCGCGTAGTGGAAGTTATATCAAGCTACT TTCTGATTG
ORF73For	GCAGTCTCCAGAGTCTTCTC
ORF73Rev	CGGAGCTAAAGAGTCTGGTG

**Tab. 1: Liste der verwendeten Oligonukleotide**

### 3 Methoden

Die Arbeiten mit Bakterien und Säugerzellen wurden in Sicherheitswerkbänken in für die Sicherheitsstufe S2 zugelassen gentechnischen Laboratorien durchgeführt. Hier beschriebene Experimente der Sicherheitsstufe S2 wurden bei der Behörde angemeldet und von dieser genehmigt (Az 64-D-1.4/03). Die unter 3.2.3, 3.3 (HUVEC und KS2616), 3.4, 3.5, 3.6.2.2 und 3.6.3 beschriebenen Arbeiten wurden unter den vorgeschriebenen Sicherheitsvorkehrungen im Laboratorium von O. Flore, New York, New York, USA, durchgeführt. Verbrauchsmaterialien wurden autoklaviert (121°C, 1 bar) oder bereits steril erworben. Die verwendeten Lösungen wurden autoklaviert oder sterilfiltriert.

Hier nicht speziell ausgeführte Methoden wurden dem Handbuch für molekularbiologische Methoden „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel *et al.*, 1997) entnommen.

#### 3.1 Klonierungstechniken

##### 3.1.1 Transformation kompetenter *E. coli*-Bakterien

Für die Transformation wurden 50 ng Plasmid-DNA mit 200 µl auf Eis aufgetauter kompetenter *E. coli*-Bakterien gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgend wurde die mit der DNA gemischte Bakteriensuspension für 30 s bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und 2 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden auf einer LB-Agar-Platte, die 50 – 100 µg/ml des Antibiotikums Ampicillin enthielt, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit den entstandenen Kolonien wurden je 2 ml LB-Flüssigkulturmedium mit 50 – 100 µg/ml Ampicillin über Nacht bei

37°C und 230 U/min im Schüttler angezogen und um die Plasmid-DNA durch Mini-Präparation (3.1.2.1) zu isolieren und die Anwesenheit des Inserts zu verifizieren. Bei einem positiven Ergebnis wurde die entsprechende Kolonie in 2 ml LB-Flüssigkulturmedium mit 50 – 100 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C und 230 U/min im Schüttler angezogen, eine Glycerinstammlösung angelegt, die sich aus 70 % der Übernachtskultur und 30 % 70 %-igem Glycerin zusammensetzte und bei – 70°C aufbewahrt wurde.

### **3.1.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Bakterien**

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Bakterien basierte auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979).

#### **3.1.2.1 Mini-Präparation**

3 ml einer Übernachtskultur wurden bei 10000 U/min, RT, für 20 min abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge Model 5415C, Rotor F-45-18-11). Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien in 300 µl S1-Puffer (Macherey-Nagel, Düren) resuspendiert. Dazu wurden 200 µl S2-Puffer (Macherey-Nagel, Düren) gegeben und durch Invertieren vermischt. Danach wurde kalter Puffer S3 (Macherey-Nagel, Düren) dazugegeben, gut vermischt und 10 min bei 14000 U/min, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA mit 1 ml Isopropanol gefällt. Es erfolgte nach einer Zentrifugation bei 14000 U/min (30 min, 4°C) die vollständige Entfernung des Überstandes und eine Trocknung der Plasmid-DNA bei Raumtemperatur. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl TE-Puffer (Macherey-Nagel, Düren) aufgenommen und bei 4°C gelagert.

### 3.1.2.2 Maxi-Präparation

Die Präparation von Plasmid-DNA aus 100 – 200 ml Übernachtskultur erfolgte mit dem Nucleobond-AX-500-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach den Anweisungen des Herstellers. In Kürze: Die Übernachtskultur wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in dem Lyse-Puffer S1-EF mit zugefügter RNase A resuspendiert und die Bakterienzellen lysiert. Anschließend wurde SDS-Puffer S2-EF und eiskalter Puffer S3-EF zugefügt. Das Lysat wurde filtriert, um chromosomale DNA und Proteine abzufangen. Hierauf folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Nach diesem wurde der Überstand auf eine Anionenaustauscher-Säule gegeben. Die Plasmid-DNA wurde an die Säule gebunden und mehrere Male mit zunächst Puffer S3-EF und dann mit Puffer S4-EF gewaschen, um Endotoxine zu entfernen. Die Plasmid-DNA wurde nachfolgend mit dem Elutionspuffer S5-EF von der Säule eluiert und mit 100%igem Isopropanol gefällt. Es folgte eine Zentrifugation, um die Plasmid-DNA zu pelletieren. Anschließend wurde die gefällte Plasmid-DNA mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die aufgereinigte DNA wurde in 150 – 300 µl TE-Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.1.3 Messung der DNA-Konzentration

Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte bei UV-Licht ( $\lambda = 280 \text{ nm}$  und  $\lambda = 260 \text{ nm}$ ) im Photometer gegen eine Leerprobe. Eine  $\text{O.D.}_{260} = 1$  entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von  $50 \mu\text{g/ml}$ .

Der Verunreinigungsgrad der DNA durch RNA oder Proteine wurde durch den Faktor  $E_{260}/E_{280}$  angegeben. Ein Faktor von ca. 1,8 entsprach gut gereinigter DNA. Es wurde eine Pufferverdünnung von 1:100 verwendet, wobei der Puffer verwendet wurde, in dem auch die DNA gelöst war.

### **3.1.4 Restriktionsverdau von DNA**

Bei der Restriktionsspaltung wurden 1 U Enzym/ $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt. Es wurde der zu dem Enzym passende Puffer der Herstellerfirma verwendet und die optimale Inkubationstemperatur nach Herstellerangaben (meist: 37°C) eingestellt.

### **3.1.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel**

Um DNA-Fragmente aufzutrennen, wurden horizontale Agarosegele in einem TAE-Puffersystem verwendet. Je nach Größe des aufzutrennenden Fragmentes wurden 0,5 – 2 % Gele hergestellt, die mit 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ethidiumbromid versehen waren, um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 2 – 5 V/ $\text{cm}^2$  durchgeführt.

Um sehr kleine Fragmente aufzutrennen (kleiner 90 bp) wurde ein 4 %-iges NuSieve-GTG-Agarosegel (Biozym Scientific, Hessisch Oldenburg) verwendet.

### **3.1.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe eines Gelextraktionskits („QIAEXII Gel Extraction Kit“, Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Das Prinzip der Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten mit Hilfe des Kits beruht auf der Solubilisierung der Agarose und auf der selektiven und quantitativen Adsorption von Nukleinsäuren an die QIAEX II Silica-Gel-Partikel in Anwesenheit eines hohen Salzgehaltes. Die Elution der DNA wird durch eine Lösung mit niedrigem Salzgehalt erreicht, wie z.B. ein Tris-Puffer oder Wasser.

### 3.1.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten über eine Säule

Um DNA-Fragmente aus einem PCR-Ansatz über eine MicroSpin S-300 HR-Säule (Amersham Biosciences, Freiburg) aufzureinigen, musste zunächst die Säule gevortext werden. Anschließend wurde der Verschluss durch eine Viertel-Umdrehung gelöst und der Verschluss am Boden musste gelöst und entfernt werden. Die Säule wurde dann in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und bei 3000 U/min, 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde daraufhin in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und der obere Verschluss wurde gelöst und verworfen. Der komplette PCR-Ansatz wurde nun auf die Säule gegeben und es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 3000 U/min für 2 min.

### 3.1.8 Ligation von DNA mit überhängenden Enden

Zuvor geschnittene und aufgereinigte DNA-Fragmente wurden unter Verwendung einer T4-DNA-Ligase, die die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen freien 5'-Phosphatgruppen und freien 3'-Hydroxylgruppen der DNA-Moleküle katalysiert, mit einem ebenfalls geschnittenen und aufgereinigten Plasmid ligiert. Für die Ligation wurde ein molarer Überschuss des Inserts im Verhältnis ca. 3:1 zum Plasmid eingesetzt. Der typische Ligationsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 1 bzw. 5 µl Vektor-DNA
- 1 bzw. 5 µl Insert-DNA
- 4 µl 5x Ligationspuffer
- 1 U T4-Ligase
- ad 20 µl A. bidest

Der Ligationsansatz wurde 5 min bei RT inkubiert und dann für die Transformation kompetenter *E. coli*-Bakterien eingesetzt.

## 3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (Mullis *et al.*, 1986) bietet die Möglichkeit, spezifische DNA-Sequenzen zu vervielfältigen, die sich zwischen zwei flankierenden sequenzspezifischen Oligonukleotiden befinden.

### 3.2.1 PCR zu Isolierung von DNA-Klonen

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion kann man ein DNA-Fragment, deren Sequenz man kennt, gezielt direkt aus beispielsweise einer Genbank herauskopieren.

Ein typischer Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

DNA (5-3000 ng)	x $\mu$ l
10 x PCR-Puffer	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 $\mu$ l
dNTPs (je 2,5 mM)	1,5 $\mu$ l
5'Primer (100 pM)	1 $\mu$ l
3'Primer (100 pM)	1 $\mu$ l
Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
A. bidest	ad 50 $\mu$ l

Das Reaktionsgemisch wurde mit 50  $\mu$ l Mineralöl überschichtet und die PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung	94°C	5 min
Denaturierung	94°C	30 s
Primer-Anlagerung	$T_m - 2^\circ\text{C}$	1 min
Kettenverlängerung	72°C	45 s
Anzahl der Zyklen	30 – 40	
Abschluß-Verlängerung	72°C	7 min

### 3.2.1.1 Konstruktion des del -59-HHV-8-Promotors mittels PCR

Der del -59-Promotor wurde mittels PCR aus dem Luciferase-Reporter-Gen-Plasmid pGL3-del -67-Promotorkonstrukt hergestellt. 50 ng bzw. 100 ng des del -67-Luciferasereporterplasmids wurden in eine PCR mit Template-spezifischen Primern eingesetzt und die Größe auf einem 4%igen NuSieve-GTG-Agarosegel (Biozym Scientific, Hessisch Oldenburg) bestimmt. Die DNA wurde ausgeschnitten, in den pGL3b-Luciferasevektor (Promega) kloniert und sowohl vom 5'- als auch vom 3'-Ende sequenziert.

### 3.2.1.2 Konstruktion des del -59SP1-HHV-8-Promotors

Die Konstruktion des del -59SP1-Promotors wurde mit Hilfe des „QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, Heidelberg) nach den Anweisungen des Herstellers vorgenommen. Dazu wurde zunächst das Ausgangsprodukt, der pGL3-del -59-Promotor, kloniert und dieses Konstrukt als Matrize für die PCR eingesetzt. Die Primer wurden so gewählt, dass jeweils 20 bp vor und 20 bp hinter der Deletionsstelle zu einem Primer zusammengefügt wurden. Die Bedingungen für die PCR-Reaktion wurden nach den Angaben des Herstellers eingestellt. Nach Abschluss der PCR wurde die Matrize mit der Restriktionsendonuklease Dpn I geschnitten, deren Substrat nur methylierte DNA ist. Die Enden der linearen DNA wurden mit Hilfe der im Kit enthaltenen Pfu-Polymerase aufgefüllt und ligiert (3.1.8).

Die Doppelstrang-Sequenzierung des del -59SP1-Promotors wurde anschließend durchgeführt.

### **3.2.1.3 Synthese des del-653-AP-2-Promotors mittels PCR**

Der AP-2-Promotor wurde mittels PCR aus humaner Plazenta-DNA hergestellt. 50 ng bzw. 100 ng der humanen Plazenta-DNA wurden in eine PCR mit Template-spezifischen Primern eingesetzt und die Größe auf einem 1%igen Agarosegel bestimmt. Die DNA wurde ausgeschnitten, zunächst in den pCR2.1Topo-Klonierungsvektor (Invitrogen) und von dort in den pGL3b-Luciferasevektor (Promega) kloniert und doppelsträngig sequenziert.

### **3.2.2 Identifizierung Insert-positiver Bakterienklone mit Hilfe der PCR (PCR-Screening)**

Um Bakterienklone mit dem gewünschten Insert zu identifizieren, wurden Bakterienklone von einer Agarplatte isoliert, in 20 µl A. bidest aufgenommen und resuspendiert. 5 µl dieser Suspension wurden in einem typischen PCR-Ansatz mit einem Reaktionsvolumen von 50 µl mit insertspezifischen Primern eingesetzt (3.2.1). Durch Auftrennung in einem Agarosegel wurde die Anwesenheit und korrekt Größe der DNA-Fragmente überprüft.

### 3.2.3 Quantitative PCR

Um eine DNA-PCR quantitativ auswerten zu können, amplifiziert man zuerst einzelne Standards mit verschiedenen Anfangskonzentrationen. Ein typischer Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1 µl Verdünnungen 1 - 9 der Kontroll-DNA in 1x PCR-Puffer und 50 µg/ ml Glycogen	
1 µl aufgereinigtes Virus zu jeder Verdünnung hinzugeben	
10 x PCR-Puffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,5 µl
dNTPs (je 2,5 mM)	2 µl
5'Primer (100 pM)	1,5 µl
3'Primer (100 pM)	1,5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
A. bidest	ad 50 µl

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung	95°C	10 min
Denaturierung	94°C	30 s
Primer-Anlagerung	58°C	45 s
Kettenverlängerung	72°C	30 s
Anzahl der Zyklen		32
Abschluß-Verlängerung	72°C	5 min

### 3.3 Kultivierung von Zelllinien

MV3-, HEK293-, HUVEC-, H460-, H1299-, HeLa tk<sup>-</sup> und KS2616-Zellen wurden als Monolayer und BC-3- und RPMI8226-Zellen als Suspensionskultur bei 37°C und 7%

CO<sub>2</sub> gehalten, wobei die Platten für die HUVEC- und die KS2616-Zelllinien vorher mit 0,2% Gelatine für 10 min bei 37°C beschichtet wurden. Als Kulturmedium wurde für die BC-3- und die RPMI8226-Zellen RPMI 1640-Medium, für die HUVEC- und die KS2616-Zelllinien 199-Medium und für alle übrigen Zellen „Dulbecco’s Modification of Eagles Medium“ (DMEM) verwandt. Dem DMEM-Medium wurden 10 % fötales Kälberserum (FKS) und dem RPMI 1640-Medium sowie dem 199-Medium 20 % fötales Kälberserum zugesetzt. Außerdem wurde zu den Medien 2 mM L-Glutamin und je 100 µg/ml Streptomycin und Penicillin zugegeben. Dem 199-Medium wurde zusätzlich noch 10 ng/ml VEGF, 10 ng/ml FGF und 1x Heparin zugegeben. Kurz vor Erreichen der Konfluenz wurden die adhärennten Zellen mit PBS<sup>-</sup> gewaschen, mit einer Trypsin-Lösung vom Boden der Zellkulturgefäße abgelöst, in frischem Medium aufgenommen und resuspendiert. Die Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:40 in neue Zellkulturgefäße überführt. Ein Medienwechsel wurde bei den BC-3- und den RPMI8226-Zellen alle zwei bis drei Tage durchgeführt, indem sie 1:2 mit frischem Medium verdünnt wurden, so dass eine ideale Zellzahl von ca.  $5 \cdot 10^5$  Zellen/ml vorhanden war. Zur Konservierung der adhärennten Zellen wurden nicht konfluent gewachsene Zellen, wie beschrieben, von dem Zellkulturgefäß abgelöst und in 2 ml Einfriermedium aufgenommen und resuspendiert. Die Suspension wurde in Kryoröhrchen überführt, diese dann in eine Einfrierbox (Nalge Europe, Neerijse, Belgien) mit Isopropanol gestellt und über Nacht bei – 70°C eingefroren. Anschließend wurden sie in flüssigem Stickstoff bei – 180°C gelagert.

Zur Kryokonservierung der Suspensionszellen wurden diese zentrifugiert, in 2 ml fötales Kälberserum aufgenommen und resuspendiert. Die Suspension wurde wie die adhärennten Zellen in Kryoröhrchen überführt und wie oben beschrieben eingefroren.

### **3.3.1 Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die adhärennten Zellen wie oben beschrieben vom Zellkulturgefäß abgelöst, in frischem Medium aufgenommen und suspendiert. Ein Aliquot wurde im Verhältnis 1:2 mit Trypan-Blau versetzt und die vitalen Zellen in einer „Neubauer“-Zählkammer gezählt.

Zur Bestimmung der Zellzahl der Suspensionszellen wurde der Zellkultur ein Aliquot entnommen und ebenfalls im Verhältnis 1:2 mit Trypan-Blau vermischt. Die vitalen Zellen wurden dann in der „Neubauer“-Zählkammer gezählt.

### **3.4 Aufreinigung des HHV-8-Virus**

#### **3.4.1 Vermehrung der Viren**

Zur Vermehrung des Humanen Herpesvirus 8 in der Lymphozytenzelllinie BC-3 wurde die konfluente Zellkultur in eine Spinnerflasche überführt und das doppelte Volumen RPMI 1640-Komplettmedium zugegeben. Die Zellen wurden 48 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde die Zellkultur in eine größere Spinnerflasche überführt. Wieder wurde das doppelte Volumen an frischem Komplettmedium zugegeben. Die Zellen wurden anschließend für weitere 48 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### **3.4.2 Isolation der Viren**

Um das Virus aus den Zellen zu isolieren, wurde zu der bereits vermehrten Zellkultur aus 3.4.1 das halbe Volumen an frischem Vollmedium zugegeben und die Zellen für weitere 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Um die Zellen ausreichend mit CO<sub>2</sub> zu versorgen, wurde die Spinnerflasche auf eine Magnetplatte gestellt und die Zellsuspension wurde mittels des dynamischen Wirbelrührers umgerührt.

Es folgte die Induktion der BC-3-Zellen mit 20 ng/ml TPA und eine weitere Inkubationsperiode von 72 h bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (Hettich Rotina 46, Rotor 4624, Tuttlingen) 1500 U/min, 10 min und 4°C. Der Überstand wurde abgenommen und bei 4°C aufgehoben. Das Pellet wurde in 5

ml PBS resuspendiert und in ein 50 ml Falcon überführt. Die Zellen wurden mittels 3 Einfrier-Auftau-Zyklen lysiert. Dabei wurde das Pellet in Trockeneis mit Ethanol gehalten, bis es gefroren war und dann wieder bei 37°C aufgetaut. Anschließend wurde RPMI1640-Medium zu dem in 5 ml resuspendierten Pellet gegeben, bis das Volumen 50 ml betrug. Darauf folgte wieder eine Zentrifugation bei 3000 U/min, 10 min und 4°C (Hettich Rotina 46, Rotor 4624, Tuttlingen). Der Überstand wurde mit dem bei der ersten Zentrifugation abgenommenen Überstand vereinigt. Das Pellet wurde verworfen. Nach und nach wurde 2,3% NaCl zu dem Überstand gegeben. Anschließend wurde ebenfalls portionsweise 7% Polyethylenglycol (PEG 6000) zugegeben, um das Virus zu binden. Der Überstand wurde ü. N. bei 4°C unter ständigem Rühren inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman Coulter, Fullerton, California, USA) bis an den Rand mit 0.1% BSA gefüllt, mit Parafilm verschlossen und ü.N. bei 4°C inkubiert.

Der Überstand wurde dann wiederum zentrifugiert (Sigma 2K15, Rotor 12148, ATR, Laurel, Maryland, USA) bei 8000 U/min, 30 min und 4°C. Dieser Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, damit das Pellet beim Abgießen des Überstandes am Boden des Falcon-Röhrchens haften bleibt und nicht verloren geht. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 1,5 ml PBS<sup>++</sup> resuspendiert. Die Suspension wurde in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, und das Zentrifugationsgefäß wurde mit 500 µl PBS<sup>++</sup> gespült. Diese Suspension wurde dann mit dem resuspendierten Pellet vereinigt. Es folgte eine Zentrifugation bei 13000 U/min, 4 min und 4°C. Der Überstand wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit PBS<sup>++</sup> auf 20 ml aufgefüllt. Dieser Überstand wurde auf 2 Ultrazentrifugenröhrchen aufgeteilt, und mit einer Pasteurpipette wurde je 1 ml 25%ige Sucroslösung in PBS auf den Boden jedes Ultrazentrifugenröhrchens gegeben. Es folgte eine Ultrazentrifugation bei 40000 U/min, 2 h und 4°C. Der Überstand wurde verworfen, und 100 µl PBS<sup>++</sup> mit 0,1% BSA wurden auf jedes Pellet gegeben und ü. N. bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Pellet resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das resuspendierte Pellet wurde in 20 µl-Aliquots aufgeteilt und bei – 70°C eingefroren.

### 3.5 Infektion von HUVEC-Zellen mit HHV-8

Natürlicherweise infiziert HHV-8 endotheliale Zellen des lymphatischen Systems. Daher wurden je  $1 \cdot 10^5$  primäre HUVEC-Zellen, welche endotheliale Zellen der humanen Nabelschnur darstellen, in einer Schale einer 6-„well“-Platte ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und es wurde ein Infektionsmix aus 700  $\mu$ l M199-Vollmedium ohne FKS, verschiedene Konzentrationen an Viruspartikeln und 4  $\mu$ g/ $\mu$ l Polybren auf die Zellen aufgetropft. Daraufhin wurden die Zellen bei 3000 U/min, 1 h und RT in einer Plattenzentrifuge zentrifugiert (Hettich Rotina 46, Rotor 4624, Tuttlingen). Anschließend wurden 2,5 ml komplettes Vollmedium zugegeben.

### 3.6 Transfektion von Zellen

Um fremde DNA in Zellen zu transfizieren, wurde entweder die Methode der Elektroporation, die Transfektion mit einem Polyethylenimin oder die Lipofektion angewandt.

#### 3.6.1 Elektroporation

Diese Methode wurde für die Transfektion der Suspensionszelllinien angewandt.

Nach Bestimmen der Zellzahl wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1200 U/min, RT, 10 min). Durch Zugabe der Elektroporationslösung wurde eine Zellzahl von  $2,9 \times 10^7$  Zellen/350  $\mu$ l Lösung eingestellt. In einer Elektroporationsküvette (BioRad) wurden 10  $\mu$ g der zu transfizierenden DNA vorgelegt und mit 350  $\mu$ l (für  $2,9 \times 10^7$  Zellen) der Zellsuspension vermischt. Die Küvette wurde für 10 min auf Eis inkubiert, danach erfolgte die Elektroporation. Es wurde eine Spannung von 230 V bei einer Kapazität von 975  $\mu$ F angelegt. Die Zellen wurden danach wiederum 10 min auf Eis

inkubiert und anschließend in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen mit 20 ml Vollmedium ausgesät und kultiviert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet.

### 3.6.2 Transfektion mit Polyethylenimin

Bei dem Transfektionreagenz JetPei (Qbiogene, Heidelberg) handelt es sich um ein lineares Polyethylenimin mit der chemischen Struktur: HO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH)<sub>n</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH. JetPei bildet zusammen mit der DNA positiv geladene Partikel, die mit den anionischen Proteoglycanen auf der Zelloberfläche interagieren und über Endocytose in die Zelle gelangen. JetPei puffert dabei den endosomalen pH-Wert und schützt so die DNA vor Degradation. Ein kontinuierlicher Protoneninflux sorgt außerdem für eine osmotische Anschwellung und Ruptur. Durch diesen Mechanismus gelangen die DNA-Partikel in das Cytoplasma.

#### 3.6.2.1 Transfektion mit einem ungekoppelten Polyethylenimin

Für die Transfektion mit JetPei wurden am Tag zuvor  $1 \times 10^4$  Zellen je Vertiefung in 24-, „well“-Zellkulturplatten in 350 µl Vollmedium ausgesät. Vor der Transfektion wurde das Medium durch 1 ml frisches Vollmedium ersetzt. In Reagenzgefäßen wurden 1 µg eines Reporterplasmids und 1 – 10 ng eines Expressionsplasmids auf 50 µl Volumen mit Medium ohne Zusätze verdünnt. Die Lösung wurde kurz auf einem Vortexer gemischt und anschließend anzentrifugiert. In einem anderen Reaktionsgefäß wurden 2 µl JetPei mit 50 µl Medium ohne Zusätze verdünnt. Diese Lösung wurde wieder kurz gemischt auf einem Vortexer und danach anzentrifugiert. In einem weiteren Schritt wurde die JetPei-Medium-Lösung zu der DNA-Lösung pipettiert und wieder kurz mit einem Vortexer gemischt. Nach dem Anzentrifugieren wurde das Gemisch 23 min inkubiert. Anschließend wurde das JetPei-DNA-Medium-Gemisch auf die Zellen pipettiert und die Zellkulturplatte wurde vorsichtig hin- und hergeschwenkt. Es folgte eine Inkubationszeit von 48 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.6.2.2 Transfektion mit einem RGD-gekoppelten Polyethylenimin

Das RGD-gekoppelte Polyethylenimin wird speziell für die Transfektion von Epithel- und Endothelzellen verwendet, welche Integrine, wie  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_V$ -enthaltende Proteine, exprimieren. Diese binden multiple Arg-Gly-Asp (RGD) Peptidsequenzen. Im Allgemeinen unterliegt der Mechanismus des DNA-Transports in die Zelle mittels JetPEI-RGD (Qbiogene, Heidelberg) dem des normalen JetPEI. Im Besonderen aber kommt es durch die chemische Kopplung eines kurzen synthetischen RGD-enthaltenden Peptides, das die natürlichen Liganden des Integrins mimikriert, zur spezifischen Interaktion zwischen den JetPEI/DNA-Komplexen und der Zelle.

Für die Transfektion mit JetPEI-RGD wurden am Tag zuvor  $3 \times 10^5$  Zellen je Vertiefung in 6-„well“-Platten in 1 ml Vollmedium ausgesät. 2 h vor der Transfektion wurde das Medium durch 400  $\mu$ l frisches Vollmedium ersetzt. In 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden 3  $\mu$ g eines Reporterplasmids auf 100  $\mu$ l Volumen mit PBS verdünnt. Die Lösung wurde kurz auf einem Vortexer gemischt und anschließend in einer Eppendorf-Tischzentrifuge 1 min anzentrifugiert. In einem anderen Reaktionsgefäß wurden 6  $\mu$ l JetPEI mit 100  $\mu$ l PBS verdünnt. Diese Lösung wurde wieder kurz gevortext und danach anzentrifugiert. In einem weiteren Schritt wurde die JetPEI-Medium-Lösung zu der DNA-Lösung pipettiert und wieder kurz gevortext. Nach dem Anzentrifugieren wurde das Gemisch 23 min inkubiert. Anschließend wurde das JetPEI-DNA-Medium-Gemisch tropfenweise auf die Zellen pipettiert und die Zellkulturplatte wurde vorsichtig geschwenkt. Es folgte eine Inkubationszeit von 48 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

### **3.6.3 Lipofektion**

#### **3.6.3.1 Transfektion mit einem kationischen Lipid**

Die Transfektion der HUVEC- und der KS2616-Zellen erfolgte unter Verwendung des liposomalen Transfektionsreagenzes Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 gemäß den Angaben des Herstellers. 24 h vor Transfektionsbeginn wurden  $1 \cdot 10^5$  Zellen in eine 24-„well“-Zellkulturplatte in M199-Vollmedium ausgesät. Die Zellen wurden 48 h mit dem Transfektionsansatz, bestehend aus M199-Vollmedium und den DNA-Lipidkomplexen, inkubiert.

#### **3.6.3.2 Transiente Transfektion von Säugerzellen mittels nicht-liposomaler Lipide**

Die nicht-liposomale Transfektion von Säugerzellen erfolgte mittels des „Effectene Transfection“-Reagenz der Firma Qiagen nach Herstellerangaben.

### **3.7 Bestimmung der Luciferase-Reportergen-Aktivität in Zellextrakten**

Um die Aktivierung von Promotoren bestimmter Gene durch die Expression der E1A-Konstrukte zu untersuchen, die zu untersuchenden Promotoren vor ein Luciferase-Reporter gen kloniert und mit den entsprechenden E1A-Konstrukten kotransfiziert (3.6). Die Aktivität des Luciferase-Reporters ist dabei ein Maß für die transaktivierenden Eigenschaften des jeweiligen E1A-Konstruktes.

48 h nach Beginn der Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen, und 200 µl Glo Lysis Puffer (Promega) direkt auf die in den Zellkulturgefäßen befindlichen adhärennten Zellen gegeben und das Lysat bei – 70°C eingefroren.

Im Anschluß daran wurden die Zellen in den Zellkulturgefäßen bei RT 30 min aufgetaut und durch auf- und abpipettieren lysiert. Das Zelllysat wurde dann in je ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 14000 U/min, 4°C zentrifugiert.

Für die Messung wurden 100 µl des Extraktes bei RT in ein Luciferase-Röhrchen vorgelegt und die Messung in einem Luminometer vorgenommen. Von dem Gerät werden automatisch je 100 µl des Assay-Reagenz in die Röhrchen eingebracht.

Luciferase-Assay-Reagenz:	20 mM Tricin
	1,07 mM Mg-Carbonat
	2,67 mM MgSO <sub>4</sub>
	0,1 mM EDTA
	33,3 mM DTT
	270 µM CoEnzymA
	530 µM ATP
	470 µM Luciferin-Lösung

Luciferin-Lösung:	100 mM Luciferin
	25 mM Glycinglycin
	15 mM MgSO <sub>4</sub>
	4 mM EDTA
	2 mM DTT

Das Luciferin wird durch Luciferyl-CoA oxidiert und Photonen werden freigesetzt, die dann gemessen und als RLU (relative Luciferaseeinheit) angegeben werden. Parallel wurde die Proteinkonzentration der Extrakte gemessen. Falls es zu unterschiedlichen Proteinausbeuten kam, wurden die erhaltenen Luciferaseeinheiten entsprechend korrigiert.

## 3.8 Proteinchemische Methoden

### 3.8.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Eukaryontenzellen

Die Zellen wurden auf einer maximal 70% konfluent gewachsenen Zellkulturschale mit PBS<sup>-</sup> gewaschen, mit einem Zellschaber in PBS<sup>-</sup> abgelöst und bei 1500 U/min, 4°C, 10 min abzentrifugiert. Für den Nachweis der Expression von E1A-Proteinen in den Zellen, wurden diese in 200 µl RIPA-Puffer, dem Proteaseinhibitoren zugesetzt wurden, resuspendiert. Anschließend wurde das resuspendierte Zellpellet in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Inkubationspause von 30 min auf Eis. Danach wurde das resuspendierte Zellpellet 15 min bei 14000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Proteinextrakte wurden grundsätzlich bei -70°C aufbewahrt.

### 3.8.2 Proteinquantifizierung

Die Bestimmung des Proteingehaltes einer Lösung erfolgte mit Hilfe des Advanced Protein Assay Reagents (Cytoskeleton, Denver, Colorado, USA). Bei Zugabe einer Proteinlösung zu diesem Reagenz erfolgt ein Farbumschwung von Grün nach Blau. Die Intensität dieses Farbumschwunges kann dann mittels der gemessenen Absorption bei 590 nm ermittelt werden. Dazu wurde 1 ml des 1x Advanced Protein Assay Reagenzes in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und 10 µl der jeweiligen Proteinlösung wurden hinzupipettiert. Das Spektrometer (WPA lightwave S2000, Cambridge, UK) wurde auf das 1x Advanced Protein Assay-Reagenz abgeglichen und die Absorption der einzelnen Proben wurde bei 590 nm gemessen. Die Absorption<sub>590nm</sub> = 1 entspricht einer Protein-Konzentration von 30 µg Protein/ml Reagenz. Somit konnte die Proteinkonzentration über die O.D.<sub>590</sub> berechnet werden,

indem die O.D.<sub>590</sub> mit 30 multipliziert wurde. Die Zahl 30 ergibt sich aus der Proteinkonzentration pro ml 1x Advanced Protein Assay-Reagenz. Da nur 1 ml eingesetzt wurde, ist diese Zahl zu vernachlässigen.

### **3.8.3 Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen**

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde das Verfahren der denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) in einem diskontinuierlichen Puffersystem angewandt (Laemmli, 1970). Die verwendeten Trenngele hatten einen Acrylamidgehalt von 4% - 12%. Es wurden NuPage Bis-Tris-Gele von Invitrogen verwendet. Die Proteinen wurden in NuPage LDS-Probenpuffer (Invitrogen) zur Denaturierung 10 min bei 70°C im Wasserbad inkubiert und dann auf das Gel geladen. Die Elektrophorese wurde zunächst bei 50 V durchgeführt bis die Proben aus den Kammern in das Gel eingelaufen waren. Anschließend wurde die Elektrophorese bei 110 V weitergeführt. Nach dem Gellauf wurde das Gel mit den aufgetrennten Proteinen auf eine Membran überführt.

### **3.8.4 Western Blotting (Harlow und Lane, 1988)**

Zum Nachweis spezifischer Proteine wurden die in der PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (Invitrogen) transferiert. Das Gel und eine PVDF-Membran gleicher Größe wurden dazu zunächst in 100 % Methanol für 30 s äquilibriert und anschließend in NuPage Transferpuffer für 10 min inkubiert. Die Proteine wurden in einer „Semi-dry-Blotting“-Apparatur (Biorad) bei einer Stromstärke von 70 mA 2 Std. bei 4°C auf die Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran mit einem Blockierungspuffer (1x TBS, 0,05% Tween 20, 5% Milchpulver) unter leichtem Schütteln bei RT für 30 min inkubiert. Der Blockierungspuffer wurde entfernt und ein spezifischer 1. Antikörper in Blockierungspuffer zugegeben. Nach einer Inkubationsdauer von zunächst 15 min bei RT und anschließend über Nacht bei 4°C

wurde die Membran 3x 5 min in 1x TBS, 0,05% Tween 20 gewaschen und mit einem spezifischen Meerrettich-Peroxidase-konjugierten 2. Antikörper 2 Std. bei RT in einer Lösung bestehend aus 1x TBS, 0,05% Tween 20, 1% Milchpulver in entsprechender Verdünnung inkubiert. Danach folgten drei weitere Waschriffe für jeweils 5 min in 1x TBS, 0,05% Tween 20. Die Detektion der Peroxidase-Aktivität erfolgte mit dem „ECL Advance Western Blotting Detection Kit“ (Amersham) nach Angaben des Herstellers. Je nach Intensität der Chemilumineszenz wurden die Röntgenfilme 5 s bis 30 min exponiert.

### **3.9 Messung der *in vitro*-Zytotoxizität mit dem MTT-Test**

Die Bestimmung der Toxizität der transient transfizierten E1A-Plasmide allein und unter Einfluss des Zytostatikums Cyclophosphamid mit dem MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid)-Test beruht auf der Messung der Tätigkeit der Mitochondrien, welche nur in lebenden eukaryontischen Zellen aktiv sind. In diesem Test wird das wasserlösliche MTT, ein Tetrazolium-Salz, durch aktive mitochondriale Dehydrogenasen in lebenden Zellen in wasserunlösliches Formazan gespalten, das in einer Färbelösung aus DMSO, Essigsäure und SDS gelöst werden kann. Die Spaltung wird begleitet von einem Farbumschlag von gelb nach violett, anhand dessen die Konzentration des Spaltproduktes photometrisch bestimmt werden kann.

#### **3.9.1 Zytotoxizitätstest nach transients Transfektion mit E1A**

Zur Messung des Anteils der überlebenden Zellen wurden 24 – 72 h nach Elektroporation der Zellen mit E1A-Plasmiden (3.6.1) je 100 µl der Zellsuspensionen in je ein well einer 96-„well“-Zellkulturplatte überführt. Zu den Zellen einer unbehandelten Kontrollreihe der 96-„well“-Zellkulturplatte wurden 20 µl 10%-iges SDS zugegeben, um die Zellen abzutöten. Anschließend wurden die Zellen auf der

Platte bei 1500 U/min, 10 min zentrifugiert (Hettich Rotina 46, Rotor 4624, Tuttlingen) und der Zellkulturüberstand entfernt. Die Zellen wurden nun mit 100 µl frischem Vollmedium pro well resuspendiert und je 12,5 µl einer 5 mg/ml MTT-Lösung in PBS zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 4 h. Danach wurde die Lösung entfernt und das entstandene wasserunlösliche Formazan in einer Färbelösung aufgenommen. Es folgte eine Inkubationspause von 30 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Die zuvor abgetöteten Zellen dienten als Hintergrund und wurden von den restlichen Werten subtrahiert. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten.

Färbelösung:            99,4% DMSO  
                              0,6% Essigsäure  
                              10% SDS

### 3.9.2 Zytotoxizitätstest nach Behandlung mit Cyclophosphamid

Für die Behandlung der transient mit E1A-Plasmiden transfizierten Zellen wurden 24 h nach Elektroporation der Zellen mit E1A-Plasmiden (3.6.1) je  $5 \cdot 10^5$  Zellen der Zellsuspensionen in je ein well einer 24-„well“-Platte überführt. Pro Ansatz wurden 6 wells ausgesät. Zu dem Kulturmedium wurden jeweils verschiedene Konzentrationen von Cyclophosphamid gegeben und weitere 28 h bzw. 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einen *in vitro*-Toxizitätstest eingesetzt, der, wie unter 3.9.1 angegeben, durchgeführt wurde.

### 3.10 Statistische Analyse

Die hier angewandten statistischen Verfahren sind von Bühl und Zöfel (1994) grundlegend beschrieben worden. In den Abbildungen wurden Mittelwerte und als Streuungsmaß der Standardfehler des arithmetischen Mittels (S.E.M.) einer

Behandlungsgruppe angegeben. Die statistischen Prüfverfahren beruhen auf einem Signifikanzniveau von  $p < 0,005$ . Die nicht normalverteilten (Kolmogorov-Smirnov-Test) und unvarianten (Levene-Test) Daten wurden mit dem U-Test nach Mann und Whitney für zwei unabhängige Stichproben untersucht. Die statistischen Prüfverfahren wurden mit dem Programm GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, Kalifornien, USA) am PC durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

Die anti-tumorale Wirkung der E1A-Genprodukte beruht auf der Fähigkeit die virale und zelluläre Genexpression direkt oder indirekt zu modulieren. Auf der Basis dieser antitumorigenen Funktionen *in vitro* und in Tiermodellen hat E1A bereits seinen Weg in klinische Studien gefunden (Hortobagyi *et al.*, 2001; Villaret *et al.*, 2002; Madhusudan *et al.*, 2004). Diese Studien zeigten die Sicherheit und die Wirksamkeit einer Gentherapie mit Plasmid-DNA-Komplexen, die E1A-Proteine von einem genomischen DNA-Stück exprimieren. Um die Sicherheit von E1A für die klinische Anwendung weiter zu verbessern, wurde die Tumorsuppressoraktivität von E1A-Deletionsmutanten überprüft, die sich als Transformationsdefekt in Melanomzellen erwiesen. Dabei konnte gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist, die transformierenden von den Tumorsuppressor Eigenschaften zu trennen (Dickopp *et al.*, 2000). Eine Transformationsdefekte Mutante von E1A, die von Ad12 abstammt (Rumpf *et al.*, 1999), hat sich als effektiver Tumorsuppressor herausgestellt (Kirch *et al.*, unpublizierte Beobachtungen).

Basierend auf diesen Ergebnissen sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob E1A in der Lage sind, Apoptose in den HHV-8-positiven Zellen zu induzieren.

Weiterhin sollte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob E1A die KSHV-positiven Zellen gegenüber einer Zytostatikabehandlung sensibilisieren können. Da für E1A-Proteine bereits bekannt ist, dass andere virale Promotoren sowohl positiv, wie bsp. den CMV-Promotor (Metcalf *et al.*, 1994) als auch negativ, wie den SV40-Promotor (Velcich und Ziff, 1985) oder den HIV-1 LTR (Song *et al.*, 1995; Tsang *et al.*, 1996) regulieren werden können, sollte untersucht werden, ob E1A die Transkription von dem LANAp regulieren kann.

## 4.1 Überprüfung der Regulation von LANAp durch E1A in HHV-8-infizierten Zellen

### 4.1.1 Bestimmung des isolierten Virustiters

Es sollte zunächst in HHV-8-positiven Zellen überprüft werden, ob die Transkription von LANAp durch E1A reguliert wird. Da aber zum einen bisher noch kein System bereit gestellt werden konnte, dass die Pathogenese des Kaposi's Sarkoms *in vitro* widerspiegelt (Bubman und Cesarman, 2003) und zum anderen Zellen aus den Läsionen des Kaposi's Sarkoms schwer zu transfizieren sind, wurden humane Nabelschnurzellen frisch mit HHV-8 infiziert (3.5).

Dazu wurden im Zuge der vorliegenden Arbeit mit HHV-8-Viruspartikeln infizierte BC-3-Zellen vermehrt (3.4.1) und anschließend aus den B-Lymphozyten isoliert (3.4.2). Da mit diesen Viruspartikeln HUVEC (Humane Endothelzellen der Nabelschnur – „Human umbilical vein endothelial cells“)-Zellen infiziert werden sollten, musste zunächst der Virustiter ermittelt werden.

Dies geschah durch eine kompetitiv-semiquantitative PCR, wobei zunächst ein genau definiertes Kompetitorfragment mittels PCR aus einem Plasmid isoliert werden musste. In der kompetitiv-semiquantitativen PCR-Reaktion wurde dann das Kompetitorfragment, bei dem es sich um eine quantifizierte DNA handelt, zusammen mit der noch nicht quantifizierten Virus-DNA amplifiziert. Da die molare Menge für das Kompetitorfragment bekannt ist, kann die Anzahl der viralen DNA-Moleküle, die in der Probe vorhanden sind, aus dem Vergleich der Bandenintensität mit der Bandenintensität des Kompetitorfragmentes berechnet werden.

#### 4.1.1.1 Isolierung und Bestimmung der molaren DNA-Menge des Kompetitors

Zunächst wurde das Kompetitorfragment aus dem bereits vorhandenen LNA Mim-Plasmid # 8.4 isoliert. Dazu wurde eine PCR mit ORF73 3'- und 5'-Primern durchgeführt. Das Plasmid selbst diente dabei als Template. Mit Hilfe dieser PCR erhielt man ein Fragment von 142 bp, welches nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus dem Gel eluiert wurde. Nach anschließender photometrischer Bestimmung der DNA-Konzentration ( $c = 170 \text{ mg}/\mu\text{l}$ ), wurde über folgende Formel die molare Menge an DNA berechnet.

Z.B.:

$$[(0,17 \mu\text{g} * 10^6 \text{ pg})/1 \mu\text{g}] * (\text{pmol}/660 \text{ pg}) * (1/N) = 1,8 \text{ pmol}$$

$N = \text{Anzahl der Basenpaare des DNA-Fragmentes}$

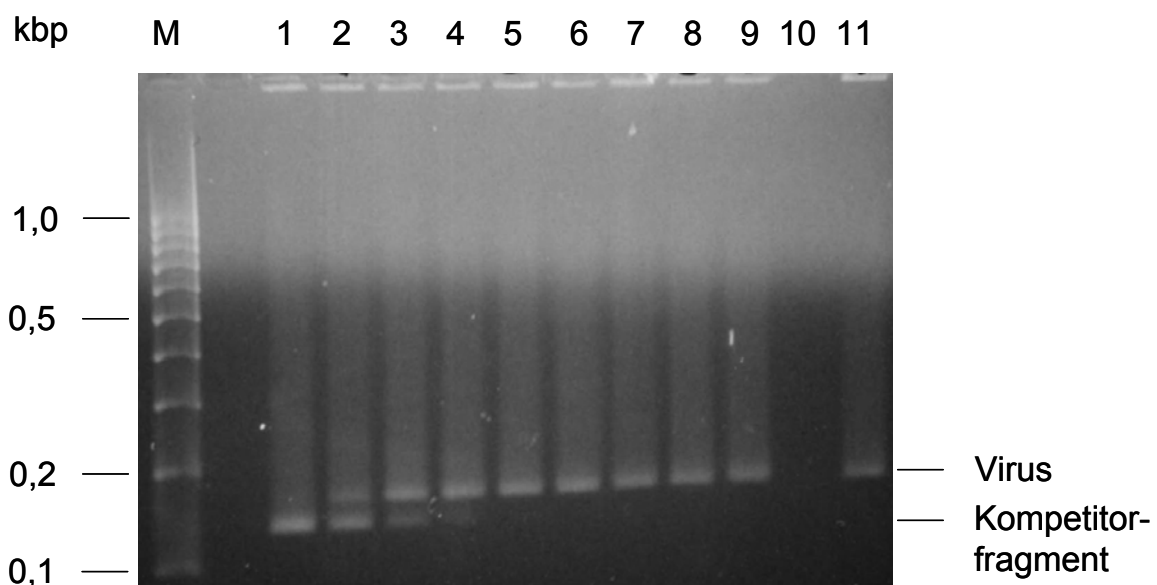
$660 \text{ pg}/\text{pmol} = \text{durchschnittliche molekulare Masse eines Basenpaares}$

Die molare Menge des Kompetitorfragmentes betrug infolgedessen  $1,8 \text{ pmol}/\mu\text{l}$  bzw.  $1,8 * 10^6 \text{ amol}/\mu\text{l}$ . Die Umrechnung in amol ist insofern von Bedeutung, da alle weiteren Konzentrationsbestimmungen der isolierten HHV-8-Partikel in amol berechnet wurden.

#### 4.1.2 Konzentrationsbestimmung der isolierten HHV-8-Partikel

Für die Infektion der HUVEC-Zellen mit HHV-8 musste zunächst die Anzahl der isolierten Virus-Partikel bestimmt werden. Bei einer Überinfektion mit HHV-8, also bei zu vielen Virus-Partikeln pro Zelle, sterben die Zellen ab. Bei zu wenig Virus-Partikeln wird nur ein kleiner Teil der Zellen infiziert. Insofern ist die Bestimmung der Anzahl der isolierten Viruspartikel wichtig für eine effiziente Infektion.

Nachdem die molare Menge der Kompetitor-DNA bestimmt werden konnte, wurde die Anzahl der HHV-8-Partikel mit Hilfe der Kompetitor-DNA und einer kompetitiv-semiquantitativen PCR bestimmt. Dazu wurde ausgehend von einer Stocklösung mit einer Konzentration von  $1.8 \cdot 10^6$  amol/ $\mu$ l eine erste Verdünnung mit einer Konzentration von 100 amol/ $\mu$ l erstellt. Ausgehend von dieser ersten Verdünnung wurden nachfolgend weitere 1:10-Verdünnungen bis zu einer Endkonzentration von  $10^{-6}$  amol/ $\mu$ l Kompetitor-DNA hergestellt. Diese Verdünnungen wurden anschließend in einer kompetitiven PCR zusammen mit 2  $\mu$ l isoliertem Virus als Template eingesetzt.

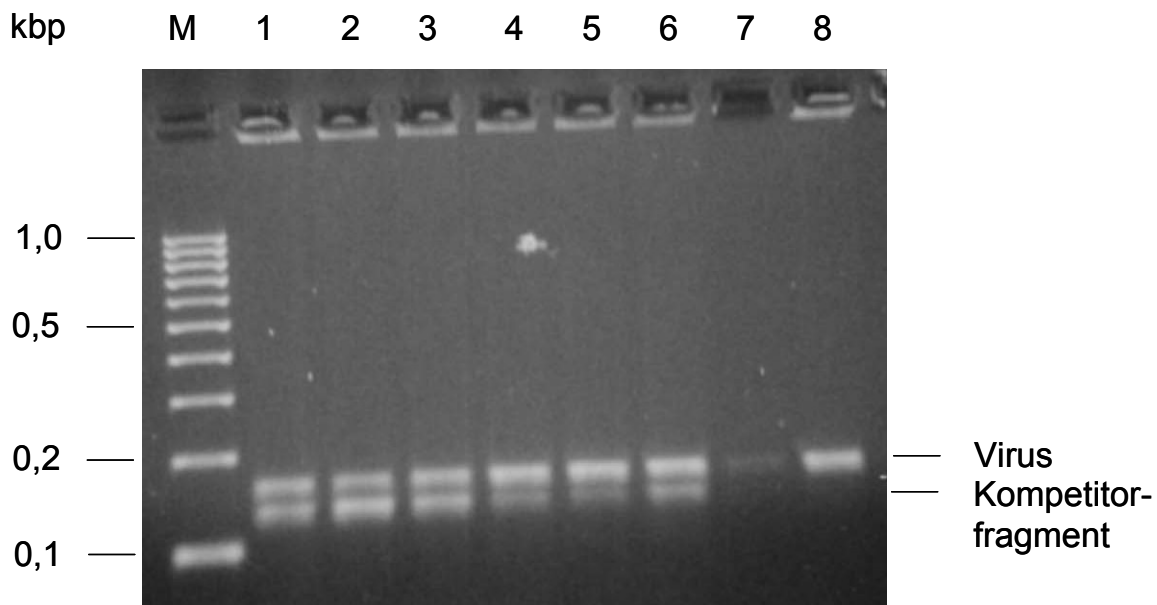


**Abb. 4: Kompetitiv-semiquantitative PCR mit isoliertem KSHV und dem Kompetitorfragment als 1:10-Verdünnungen von 100 amol/ $\mu$ l bis  $10^{-6}$  amol/ $\mu$ l.** Das Virus wurde aus der HHV-8-positiven B-Zelllinie BC-3 isoliert und zur Quantifizierung in einer kompetitiven PCR eingesetzt. Das Kompetitorfragment diente zur Analyse der erhaltenen Virusmenge. Die amplifizierte DNA wurde auf einem 2%-igen Agarosegel aufgetrennt. Es wurden jeweils 20  $\mu$ l des PCR-Ansatzes eingesetzt. Die molare Menge des Kompetitorfragmentes wurde wie folgt aufgetragen: Spur 1 = 100 amol/ $\mu$ l; Spur 2 = 10 amol/ $\mu$ l; Spur 3 = 1 amol/ $\mu$ l; Spur 4 =  $10^{-1}$  amol/ $\mu$ l; Spur 5 =  $10^{-2}$  amol/ $\mu$ l; Spur 6 =  $10^{-3}$  amol/ $\mu$ l; Spur 7 =  $10^{-4}$  amol/ $\mu$ l; Spur 8 =  $10^{-5}$  amol/ $\mu$ l; Spur 9 =  $10^{-6}$  amol/ $\mu$ l; Spur 10 = Negativkontrolle; Spur 11 = Viruskontrolle ohne Kompetitorfragment. Als Molekulargewichtsmarker wurde in Spur M eine 100 bp DNA-Leiter verwendet.

Aufgetragen auf einem 2%-igen Agarosegel konnte man in den ersten vier Proben zwei Banden sehen (Virus-Amplikon und Kompetitor-DNA), in den folgenden Ansätzen war die Menge an Kompetitor-DNA zu gering, als dass man sie hätte auf dem Gel erkennen können. Die Virusbande hatte eine Größe von 169 bp und die Bande auf der Höhe von 142 bp entspricht dem Kompetitorfragment. Anhand der

Stärke der beiden Banden konnte abgelesen werden, innerhalb welcher Verdünnungsstufe die Viruskonzentration lag, d.h. beide Banden mussten die gleiche Stärke aufweisen. Die äquimolare Menge der beiden Produkte stellte sich zwischen 1 und 10 amol/ $\mu$ l ein, da bei einer molaren Menge von 10 amol/ $\mu$ l des Kompetitorfragmentes die Bande des Kompetitors stärker ist als die des Virus und bei einer molaren Menge von 1 amol/ $\mu$ l der Kompetitor-DNA verhielten sich die beiden Bandenstärken umgekehrt (Abb. 4)

Ausgehend von der Verdünnung mit einer Konzentration von 10 amol/ $\mu$ l wurden daraufhin nachfolgend weitere 1:2-Verdünnungen bis zu einer Endkonzentration von 0,625 amol/ $\mu$ l hergestellt. Diese Verdünnungen wurden dann wie o.a. in der kompetitiven-semiquantitativen PCR als Template eingesetzt. Zusätzlich wurden auch die Verdünnungen 1 und 10 amol/ $\mu$ l verwendet. Wieder wurde zu jeder Verdünnung isoliertes Virus gegeben.



**Abb. 5: Zweite kompetitive PCR mit isoliertem HHV-8-Virus und dem Kompetitorfragment als 1:2-Verdünnungen von 10 amol/ $\mu$ l bis 0,625 amol/ $\mu$ l.** Das Virus, das aus der KSHV-positiven B-Zelllinie BC-3 isoliert wurde, wurde zur Quantifizierung in einer kompetitiven PCR eingesetzt. Das Kompetitorfragment diente wiederum zur Analyse der erhaltenen Virusmenge. Die amplifizierte DNA wurde auf einem 2%-igen Agarosegel aufgetrennt. 2  $\mu$ l des Virusüberstandes wurde als Template verwendet ohne die virale DNA zu isolieren. Die Konzentration des Kompetitorfragmentes wurde wie folgt aufgetragen: Spur 1 = 10 amol/ $\mu$ l; Spur 2 = 5 amol/ $\mu$ l; Spur 3 = 2,5 amol/ $\mu$ l; Spur 4 = 1,25 amol/ $\mu$ l; Spur 5 = 0,625 amol/ $\mu$ l; Spur 6 = 1 amol/ $\mu$ l; Spur 7 = Negativkontrolle; Spur 8 = Viruskontrolle ohne Kompetitorfragment. Als Molekulargewichtsmarker wurde in Spur M eine 100 bp DNA-Leiter verwendet.

Auf einem 2%-igen Agarosegel waren die beiden Banden, die des Kompetitors bei 142 bp und die des Virus bei 169 bp, zu sehen. Die abgelesene Konzentration des

Virus betrug ca.  $2,5 \text{ amol}/\mu\text{l}$ , da beide Banden bei dieser Konzentration eine etwa gleiche Stärke aufwiesen. Die Wasserkontrolle zeigte eine Kontamination mit Virus.  $1 \text{ amol}$  entspricht  $10^{-18} \text{ mol}$ , und dies entspricht wiederum ca.  $6 \cdot 10^5$  Molekülen. Insofern betrug die virale DNA-Konzentration ca.  $1,5 \cdot 10^6$  Moleküle pro  $\mu\text{l}$ , wobei ein Molekül einer Kopie des viralen Genoms entspricht (Abb. 5; Curreli *et al.*, 2003).

Nachdem die Konzentration des isolierten Virus bestimmt war, konnten humane Nabelschnurzellen mit dem aus den BC-3-Zellen isolierten KSHV infiziert werden, um +-anschließend in diesen Zellen sowohl den Einfluss von E1A auf den Promotor der latenten Gene von HHV-8 als auch den Einfluss von E1A auf das Proliferationsverhalten der KSHV-positiven Zellen untersuchen zu können. Da aber eine erfolgreiche Infektion nicht nachgewiesen werden konnte, wurden die Experimente einer HHV-8-positiven B-Zelllinie fortgeführt.

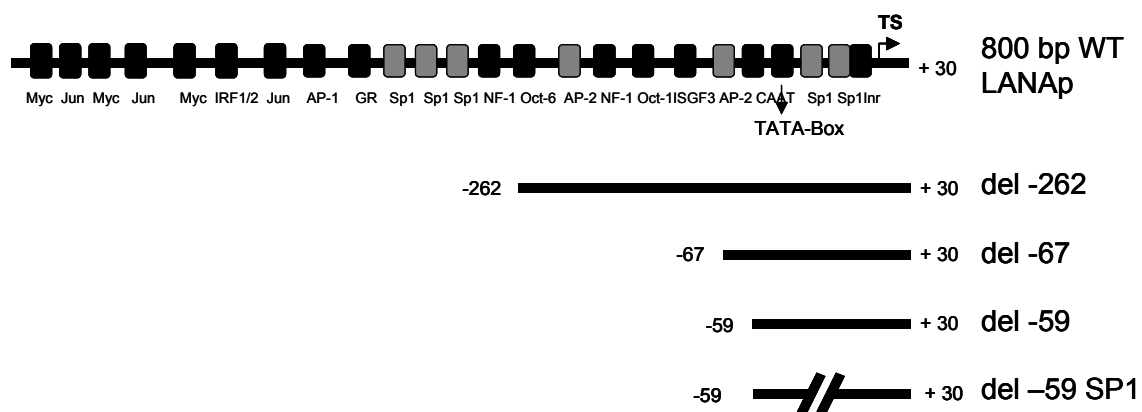
## 4.2 Promotorkonstrukte

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte die Regulation des LANAp durch E1A untersucht werden. Der LANAp trägt einige Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Von besonderer Bedeutung für die vorliegende Arbeit waren dabei die Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-2 und SP1. Von diesen beiden Transkriptionsfaktoren ist bekannt, dass E1A-Proteine mit diesen interagieren (Somasundaram *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1995). Durch die Bindung der E1A-Proteine an die Transkriptionsfaktoren wird die Genexpression der jeweiligen Zielgene reguliert.

Daher sollte im Zuge der vorliegenden Arbeit in verschiedenen Zelllinien sowohl die Funktionalität des LANAp und seiner Deletionsmutanten als auch der Einfluss von E1A auf diese Promotoren untersucht werden. Als Kontrollpromotoren dienten dabei der  $\text{del } -653\text{-AP-2-Promotor}$  (nachfolgend AP-2-Promotor genannt), der hTERT-Promotor, der *Hsp70*-Promotor und der SV40-Promotor. Diese Promotoren wurden gewählt, weil schon gezeigt werden konnte, dass sie durch E1A reguliert werden, wie der hTERT-Promotor, der *Hsp70*-Promotor und der SV40-Promotor und/oder weil sie AP-2-Bindungsstellen tragen, wie der AP-2-Promotor und der hTERT-Promotor.

#### 4.2.1 Deletionsmutanten des LANAp

Somasundaram *et al.* (1996) gehen davon aus, dass E1A-Proteine über die Interaktion mit AP-2 zahlreiche zelluläre Gene reprimiert. Kim *et al.* (1995) haben gezeigt, dass E1A-Proteine die Genexpression des Insulinrezeptors über SP1-Bindungsstellen aktiviert. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob der LANAp durch E1A supprimiert oder aktiviert wird. Für diese Untersuchungen haben wir dankenswerterweise drei Promotorkonstrukte von Y. Chang (Columbia University, New York) zur Verfügung gestellt bekommen. Alle drei Promotorkonstrukte liegen in dem Luciferase-Reportervektor pGL3 (Promega GmbH, Mannheim) vor.



**Abb. 6: Schematische Darstellung des LANAp und Promotorfragmente.** Der WT-LANAp ist stellvertretend für die anderen Konstrukte mit den wichtigsten Transkriptionsfaktorbindungsstellen gezeigt. Diese sind nicht maßstabsgetreu dargestellt. Für diese Arbeit von Bedeutung waren insbesondere die AP-2- und SP1-Bindungsstellen, welche hier grau gezeichnet sind. Diese Konstrukte wurden bereits von Sarid *et al.* (1999) beschrieben. Der del -59-Promotor, bei dem die letzte AP-2-Bindungsstelle entfernt wurde und der del -59SP1-Promotor, mit einer Deletion der ersten SP1-Bindungsstelle flussabwärts der TATA-Box, wurden im Rahmen dieser Arbeit angefertigt. (Alle Promotorkonstrukte liegen in dem Luciferase-Reportervektor pGL3 vor).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten weitere Mutanten durch Deletion im 5'-Bereich des Promotors hergestellt werden, um die Auswirkungen einzelner Transkriptionsfaktoren sowohl auf die Aktivität des Promotors als auch auf den Einfluss von E1A gegenüber dem Promotor zu untersuchen.

#### 4.2.1.1 Die Promotordeletionsmutante del -59

Um im Rahmen dieser Arbeit den Einfluss des Transkriptionsfaktors AP-2 auf die Basisaktivität des LANAp und auf seine Regulation durch E1A zu untersuchen, mussten alle AP-2-Bindungsstellen deletiert werden. Ausgehend von der kleinsten Deletionsmutante, dem del -67-Promotor (Abb. 6), wurde mittels PCR, bei der die schnittstellenspezifischen Primer HHV-8-1-D-KpnI-For und HHV-8-1-D-XhoI-Rev verwendet wurden, die AP-2-Bindungsstelle deletiert. Das gewünschte 89 bp-Fragment wurde anschließend über eine Säule aufgereinigt, mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *XhoI* verdaut und nachfolgend in den Luciferasevektor pGL3B kloniert. Die korrekte Sequenz der Promotormutante wurde mittels Sequenzierung überprüft und nachfolgend als „del -59“ bezeichnet.

#### 4.2.1.2 Die Promotordeletionsmutante del -59SP1

Weiterhin sollte der Einfluss des Transkriptionsfaktors SP1 sowohl auf die Basisaktivität des LANAp und als auch auf die Regulation des Promotors durch E1A analysiert werden. Dazu wurde die erste SP1-Bindestelle stromabwärts der TATA-Box deletiert. Die Deletionsmutante del -59SP1-Promotor wurde mittels gerichteter Mutagenese aus dem del -59-Promotor (Abb. 6) im PCR-Verfahren unter Zuhilfenahme des „QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kits“ (Stratagene, Amsterdam) mittels geeigneter Primer hergestellt und durch Sequenzierung verifiziert. Mit Hilfe dieser Deletionsmutante sollte die Bedeutung der SP1-Bindungsstelle sowohl auf die Basisaktivität des Promotors als auch auf den Einfluss von E1A auf den Promotor untersucht werden. E1A-Proteine binden ebenfalls an den Transkriptionsfaktor SP1 und ist über diese Interaktion in der Lage, die Genexpression der Zielgene von SP1 zu regulieren (Kim *et al.*, 1995).

Promotorkonstrukt	Fragestellung	Referenz
del-59-Promotor	Rolle von AP-2	Somasundaram <i>et al.</i> , 1996
Del-59SP1-Promotor	Rolle von SP1	Kim <i>et al.</i> , 1995

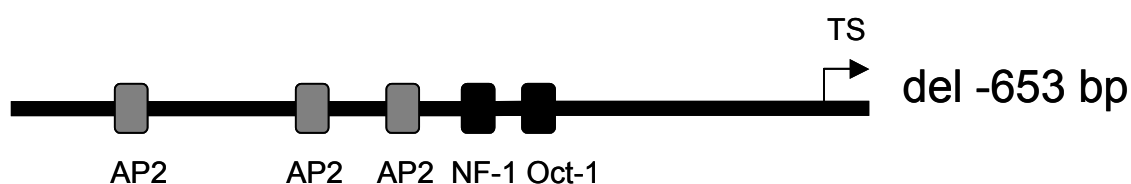
**Tab. 2: Aufstellung der neu klonierten Konstrukte des LANAp.** Angegeben ist die jeweilige Fragestellung zu dem zugehörigen Promotorkonstrukt von LANAp. Die Referenz ist ebenfalls vermerkt.

#### 4.2.2 Der del -653-AP-2-Promotor

Da bereits bekannt war, dass E1A-Proteine mit dem Transkriptionsfaktor AP-2 interagieren (s.o.), sollte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von E1A auf die Regulation des AP-2-Promotors untersucht werden.

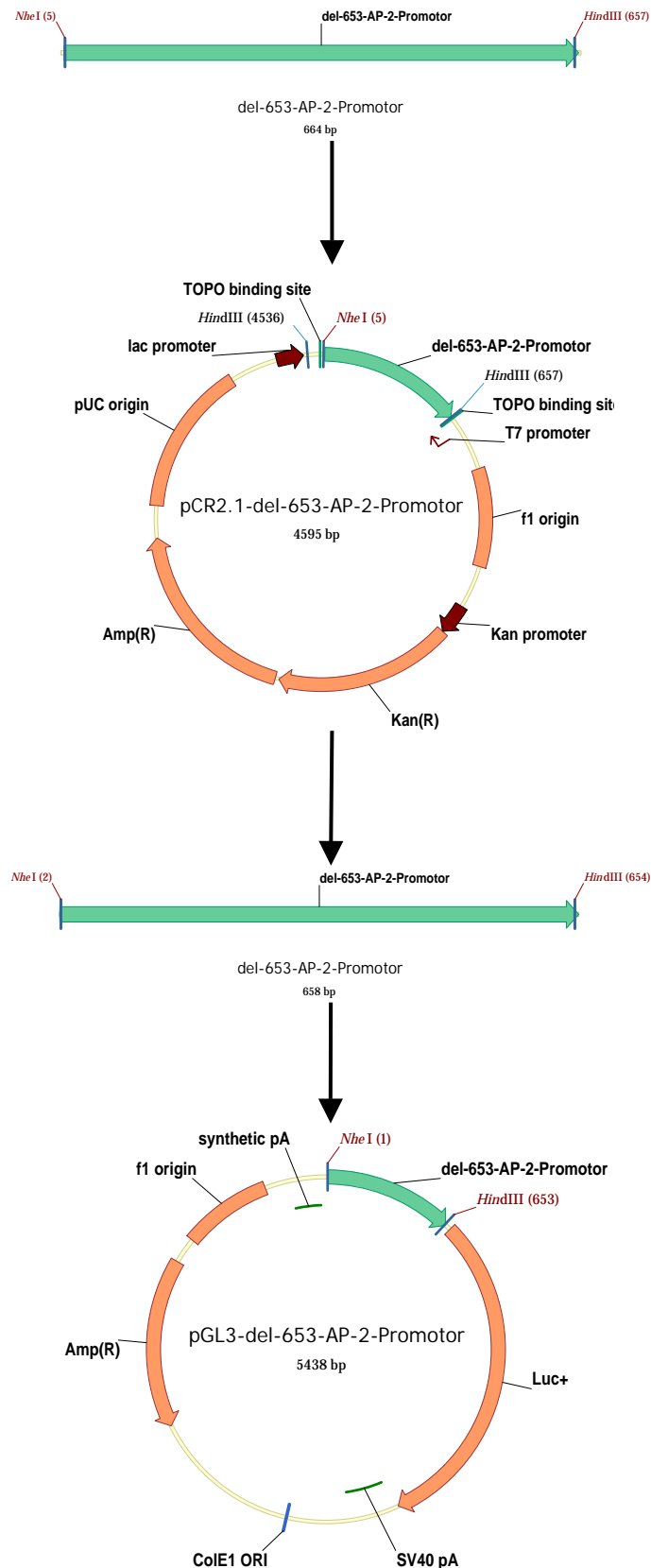
Weiterhin konnte im Zuge dieser Arbeit gezeigt werden, dass der LANAp durch E1A aktiviert wird (4.6.1). Dies wurde auch bereits für den hTERT-Promotor nachgewiesen (Kirch *et al.*, 2002).

Da der LANAp und der AP-2-Promotor zahlreiche Bindestellen für den Transkriptionsfaktor AP-2 tragen, sollte hier überprüft werden, ob der AP-2-Promotor ebenfalls durch E1A aktiviert wird. Für diese Untersuchungen wurde der del -653-Promotor generiert.



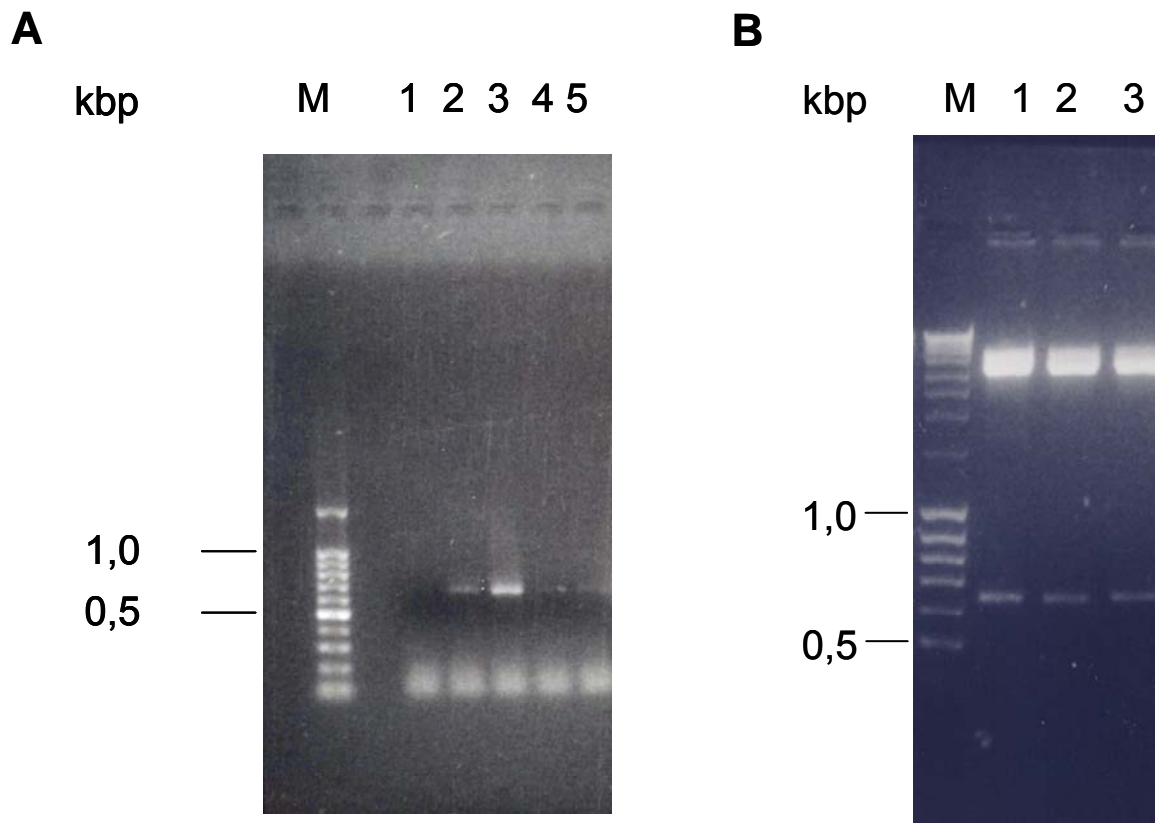
**Abb. 7: Schematische Darstellung des del -653-AP-2-Promotorfragmentes.** Der del -653-AP-2-Promotor mit den wichtigsten Transkriptionsfaktorbindungsstellen, welche nicht maßstabsgetreu dargestellt sind. Für diese Arbeit von Bedeutung waren insbesondere die AP-2-Bindungsstellen, welche hier grau gezeichnet sind. Das Promotorkonstrukt liegt in dem Luciferase-Reportervektor pGL3 (Promega GmbH, Mannheim) vor.

Die Ausgangsbasis für den AP-2-Promotor (Abb. 7) stellte humane Plazenta-DNA dar. Es wurde eine PCR mit den Primern AP-2-Prom-NheI-For und AP-2-Prom-HindIII-Rev durchgeführt. Dabei wurden Primer generiert, die bereits die Sequenzen für geeignete Schnittstellen trugen (Abb. 9A).



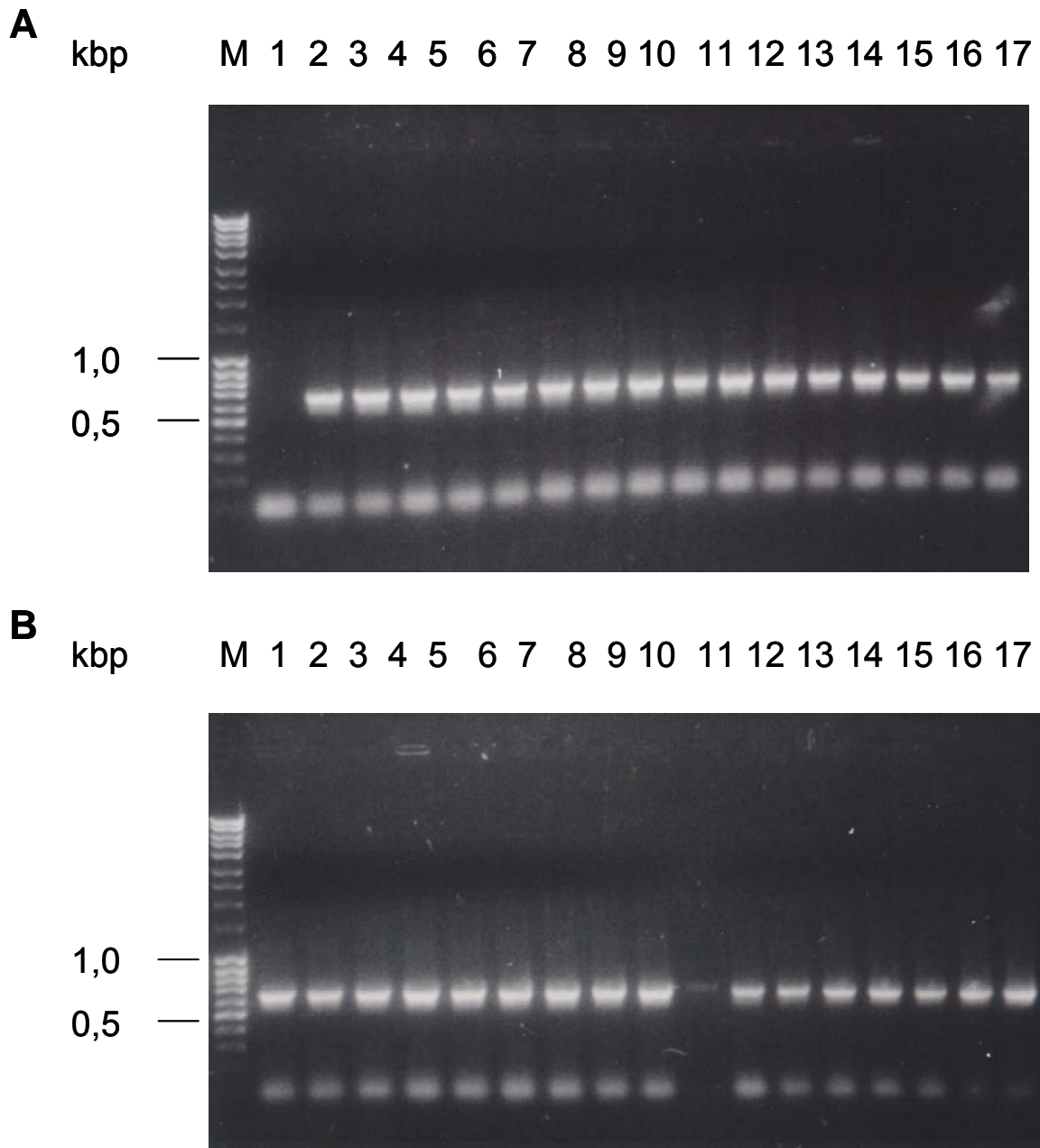
**Abb. 8: Klonierungsschema am Beispiel des del –653-AP-2-Promotors.** Zunächst wurde eine PCR mit geeigneten Primern, die die Sequenzen für die Restriktionsschnittstellen *NheI* und *HindIII* trugen, durchgeführt. Als Template diente dabei humane Plazenta-DNA. Nach Aufreinigung des erhaltenen PCR-Fragmentes (grün) wurde dieses in den pCR2.1-Topo-Klonierungsvektor kloniert. Aus diesem wurde das del –653-Promotorfragment mittels Restriktionsverdau isoliert und in den Luciferase-Reportervektor pGL3b kloniert.

Die gewünschten 653 bp-Fragmente wurde aus dem Gel ausgeschnitten und isoliert. Das so gewonnene DNA-Fragment wurde anschließend in den pCR2.1-Topo-Klonierungsvektor kloniert. Die Kontrolle der erfolgreichen Insertion erfolgte durch den Verdau der DNA mit den Enzymen *NheI* und *HindIII* (Abb. 9B).



**Abb. 9: Isolierung des del -653-Promotorfragmentes aus humaner Plazenta-DNA mittels PCR (A) und Analyse des del-653 -AP-2-Promotorfragments durch Verdau nach Klonierung in den pCR2.1-Topo-Vektor (B).** (A) Ausgehend von humaner Plazenta-DNA und unter Verwendung der schnittstellentragenden Primer AP-2-Prom-*NheI*-For und AP-2-Prom-*HindIII*-Rev wurde das 653 bp-Fragment des AP-2-Promotors amplifiziert und auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt. Es wurden jeweils 15  $\mu$ l des PCR-Ansatzes aufgetragen. (B) Das 653 bp-Promotorfragment wurde in den pCR2.1-Topo-Klonierungsvektor (Invitrogen) ligiert. Anschließend wurde das Fragment, nachdem die DNA mittels Mini-Präparation isoliert wurde, mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *Hind III* wieder aus dem Klonierungsvektor ausgeschnitten und auf einem 1,3%-igen Agarosegel aufgetrennt. In die Spuren 1 bis 3 wurden jeweils 15  $\mu$ l des Restriktionsansatzes aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurde in Spur M jeweils die MassRuler DNA Ladder, Mix verwendet.

Es wurden alle drei 653 bp DNA-Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Dann folgte die Ligation mit dem Luciferasevektor pGL3. Es folgte die Identifizierung Insert-positiver Bakterienklone mittels PCR.

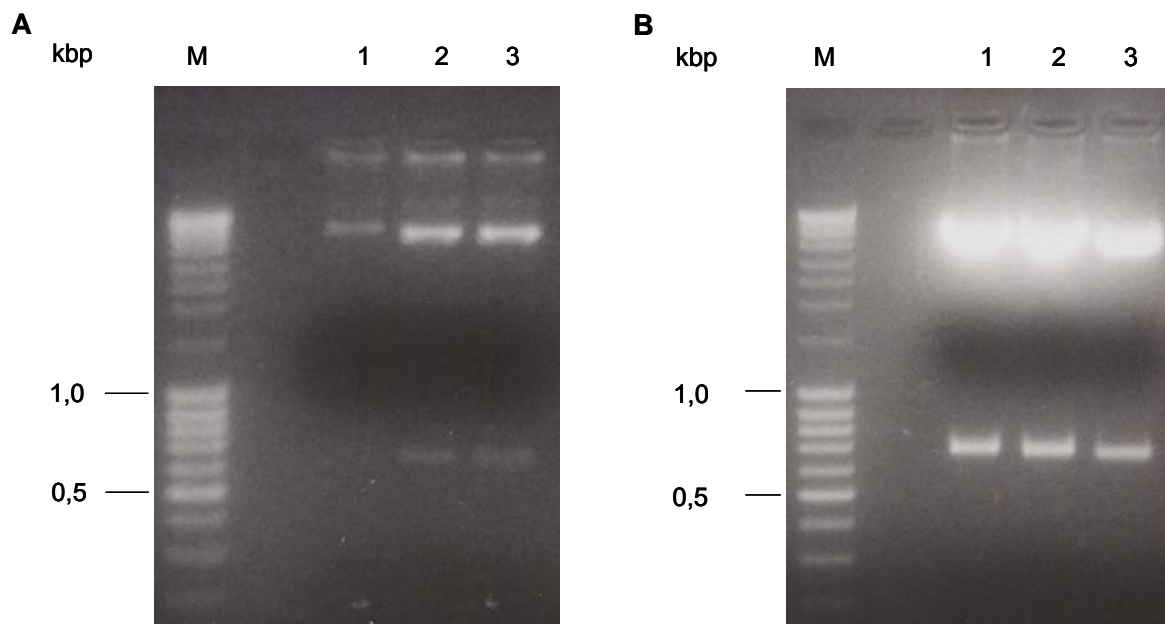


**Abb. 10: Identifizierung der Bakterienklone mit 653-bp Insert mit Hilfe von PCR.** Die bakterielle DNA der transformierten Klone wurde mittels PCR amplifiziert und auf ein 1,3%-iges Agarosegel aufgetragen. Es wurden jeweils 5  $\mu$ l in die Spuren 1 bis 17 (A) und (B) aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurde in Spur M die „MassRuler DNA Ladder“ verwendet.

Die Klone, die in Abb. 10B Spuren 13 – 15 als positiv für das 653-bp Insert identifiziert wurden, wurden ausgewählt, um Bakterienkulturen für eine Plasmid-Minipräparation anzupflanzen und die Plasmid-DNA zu isolieren. Anschließend wurde die DNA wieder mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *HindIII* verdaut.

Der Insert-positive Bakterienklon wurde zum Anpflanzen einer Bakterienkultur für die DNA-Maxi-Präparation verwendet. Zur Kontrolle wurde diese Plasmid-DNA nach der

Isolierung mittels Maxi-Präparation erneut mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *HindIII* verdaut. Das Promotorkonstrukt wurde mittels Sequenzierung verifiziert.



**Abb. 11: Analyse des pGL3-del-653 -AP-2-Promotors durch Verdau mit den Enzymen *NheI* und *HindIII* nach Mini-Präparation (A) und Kontrolle des klonierten pGL3-del-653 -AP-2-Promotorkonstrukts mittels Verdau mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *HindIII* nach Maxi-Präparation.** Die Plasmid-DNA der als Insert-positiv ausgewählten Bakterienklone wurde mittels DNA-Mini-Präparation isoliert und nach dem Verdau auf einem 1,3%-igen Agarosegel aufgetrennt (A). Die Plasmid-DNA des Insert-positiv ausgewählten Bakterienklons wurde isoliert und nach dem Verdau auf einem 1,3%-iges Agarosegel aufgetrennt. In Spur 1 wurde die Plasmid-DNA aufgetragen, die sequenziert werden sollte, in Spur 2 wurde die isolierte Plasmid-DNA aus der Maxi-Präparation und in Spur 3 wurde die isolierte Plasmid-DNA aus der o.a. Mini-Präparation aufgetragen (B). In Spur M wurde jeweils der Größenmarker (MassRuler) aufgetragen. Es wurden jeweils 15 µl des Restriktionsansatzes aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurde in Spur M die „MassRuler DNA Ladder“ verwendet.

### 4.3 Funktionalität und Vergleich der Basisaktivität verschiedener Promotorkonstrukte

Um die Funktionalität und die Basisaktivität der Promotorkonstrukte in den verschiedenen Zelllinien zu überprüfen, wurde in transienten Expressionsstudien die Aktivität der LANAp-, AP-2- und *Hsp70*-Promotorkonstrukte mittels der Expression des Luciferase-Reportergens untersucht. Dazu wurden zunächst die KS2616- und die HUVEC-Zellen transient mit den LANAp-Luciferase-Reporterplasmiden

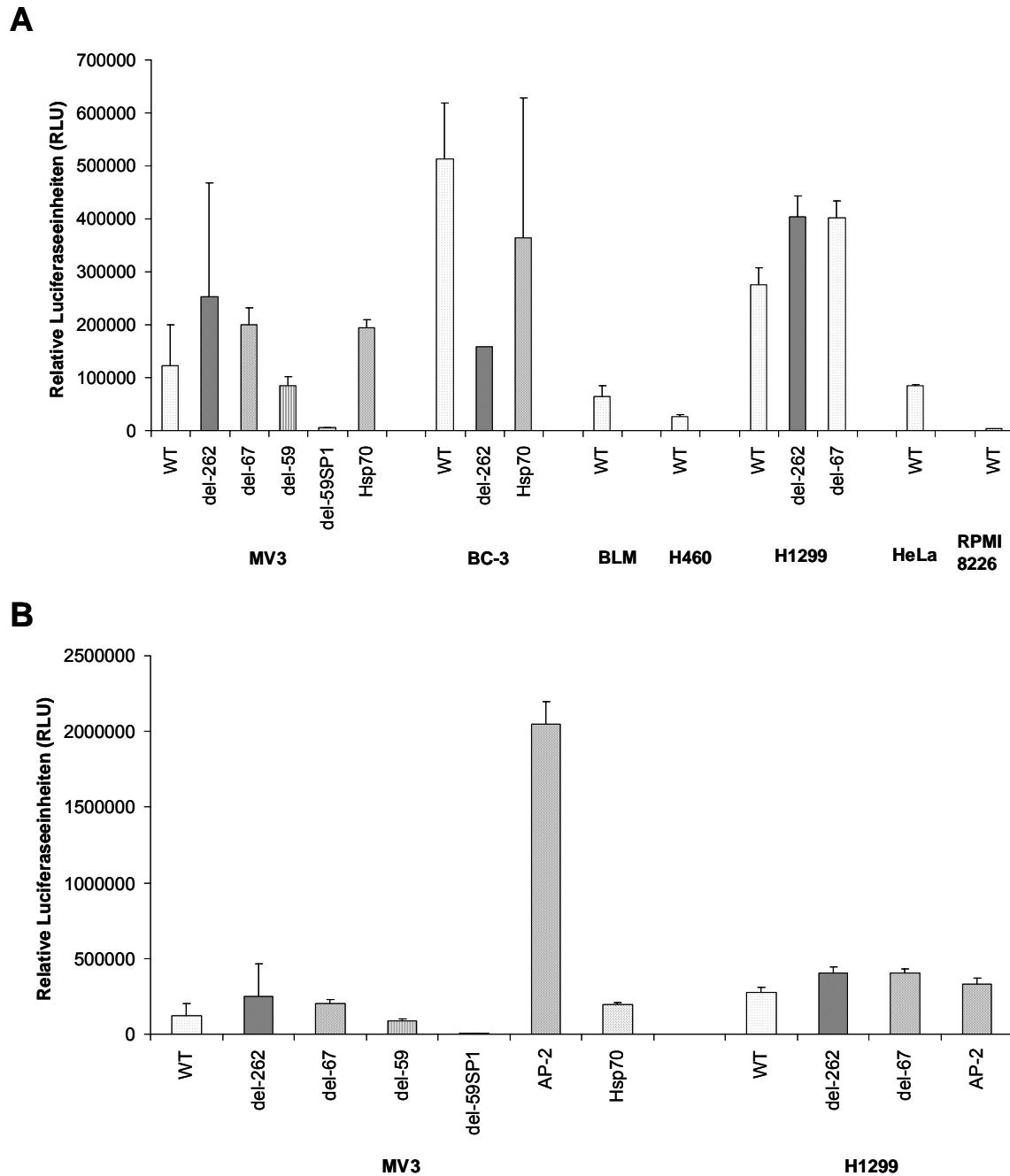
transfiziert und die Expression der Luciferase als Maß der Promotoraktivität gemessen. Da diese Zellen aber mit verschiedenen Transfektionsreagenzien entgegen den Angaben des Herstellers nicht effizient transfiziert werden konnten (Daten nicht gezeigt), wurden andere, leichter zu transfizierende Zelllinien verwendet, darunter zunächst die Melanomzelllinie MV3, die bereits als effiziente Zelllinie für E1A-Ko-Transfektionsstudien etabliert wurde. Anschließend wurde aber auch die HHV-8-positive B-Zelllinie BC-3 verwendet, um die nachfolgenden Untersuchungen in einer HHV-8-positiven Zelllinie verifizieren zu können, die auch hinreichend gut zu transfizieren war.

In der Melanomzelllinie MV3 zeigte der WT-LANAp eine geringere basale Aktivität als die beiden kürzen Promotorkonstrukte del -262 und del -67. Deletionen im 5'-Bereich des WT-LANAp erhöhten die basale Promotoraktivität. Ein Konstrukt, das aus nur noch 89 bp bestand, war in der Lage, die Transkription des Reportergens fast genauso gut zu steuern wie das del -262-Plasmid. Das Promotorkonstrukt del -59 zeigte eine stark erniedrigte basale Aktivität. Das HHV-8-Promotorkonstrukt del -59SP1, bei dem nur noch eine SP1-Bindungsstelle vorhanden ist, konnte nur noch minimal aktiviert werden.

Die basale Aktivität des WT-LANAp zeigte sich in der HHV-8-positiven Lymphomzelllinie BC-3 gegenüber den Beobachtungen in den Melanomzellen und den Lungenkarzinomzellen deutlich erhöht. In den BC-3-Zellen wurde eine deutliche Verringerung der basalen Aktivität des del -262 Promotors gegenüber dem WT bp-Promotor beobachtet.

Auch bei dem *Hsp70*-Promotor war eine deutlich höhere basale Aktivität in den HHV-8-positiven Lymphomzellen zu erkennen als in den Melanomzellen.

In der Melanomzelllinie BLM konnte, verglichen mit den MV-3 Zellen, eine schwächere Basisaktivität des WT-LANAp beobachtet werden. In der Lungenkarzinomzelllinie H460 war die basale Aktivität stark vermindert. Im Gegensatz dazu war die Basisaktivität des WT-LANAp in der Lungenkarzinomzelllinie H1299 um ca. 50 % höher als in der Melanomzelllinie MV3. In der Lungenkarzinomzelllinie H1299 konnte wieder eine stärkere basale Aktivität des del -262 Konstrukts im Vergleich zu dem WT-Promotor beobachtet werden.



**Abb. 12: Funktionskontrolle und Vergleich der Aktivität verschiedener LANap-Konstrukte in unterschiedlichen Zelllinien.** transfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h nach Transfektion gemessen. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte und die mittleren Standardabweichungen eines repräsentativen Experimentes in Dreifachbestimmung. In **A** ist die Basisaktivität der Promotorkonstrukte von LANap im Vergleich mit der Aktivität des *Hsp70*-Promotors in verschiedenen Zelllinien dargestellt. In **B** wird die Basisaktivität der Promotorkonstrukte von LANap mit dem AP-2-Promotor in MV3- und H1299-Zellen verglichen. RLU sind die „Relative light units“ und diese geben die Intensität der Luciferase an.

Hier war eine deutlich stärkere Aktivierung zu erkennen. Analog den Ergebnissen in den Melanomzellen war hier ebenfalls keine Erhöhung der basalen Aktivität des del – 67-Promotors zu erkennen. Die Stärke der Aktivierung entsprach in etwa der Basisaktivität des del-262-Promotors.

In der Zervix-Karzinomzelllinie HeLa konnte eine um ca. 25 % reduzierte Aktivität des WT-LANAp beobachtet werden, verglichen mit den MV3-Zellen.

In Raji-Zellen (Zellen aus einem Burkitt-Lymphom) konnte nur eine minimale Basisaktivität des WT LANAp beobachtet werden, die vergleichbar war mit der beobachteten Basisaktivität des del-59SP1-Promotors in der Melanomzelllinie MV3.

Der AP-2-Promotor zeigte eine wesentlich stärkere basale Aktivität als der WT-LANAp in der Melanomzelllinie MV3 (Abb. 12B).

Die basale Aktivität des AP-2-Promotors war in den Lungenkarzinomzellen im Vergleich mit den Melanomzellen etwa um 75 % reduziert.

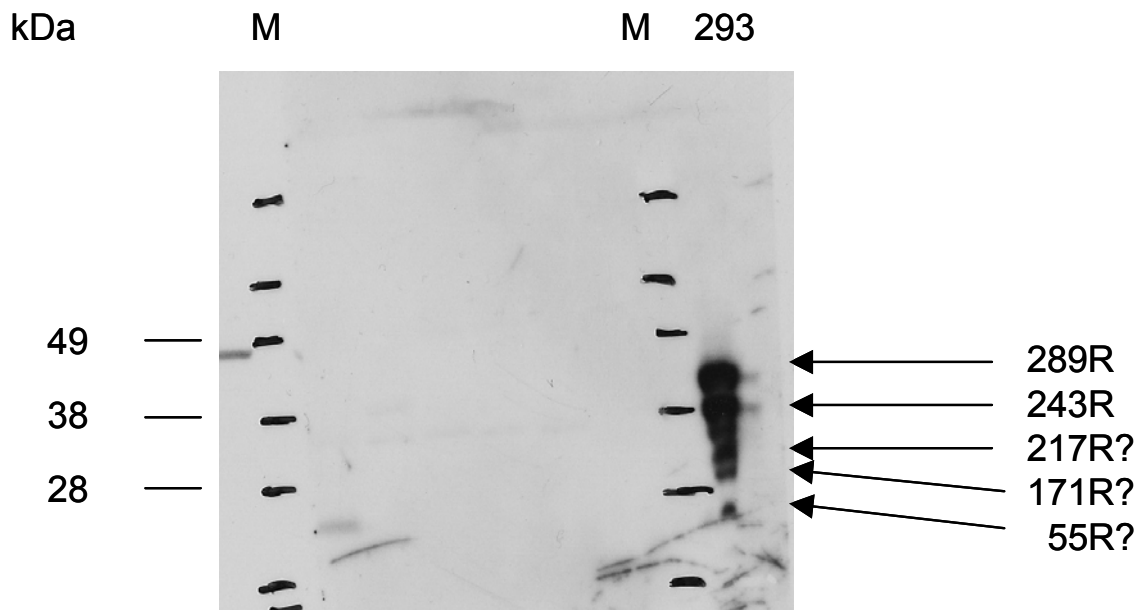
Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl die von Y. Chang erhaltenen Promotorkonstrukte als auch die selbst klonierten Promotorkonstrukte funktionell aktiv sind. Weiterhin konnte eine ausreichende Basisaktivität der Promotorkonstrukte in der Melanomzelllinie MV3 bewiesen werden, so dass diese Zelllinie ob ihrer hohen Transfektionseffizienz für nachfolgende Experimente verwendet werden konnte. Ebenso zeigten die Promotorkonstrukte in HHV-8-positiven Zelllinie BC-3 eine ausreichende basale Aktivierung, so dass diese ebenfalls für die nachfolgenden Experimente eingesetzt werden konnte.

Weiterhin ist die erste Bindestelle für den Transkriptionsfaktor AP-2 stromabwärts des Transkriptionsstarts auf dem LANAp wichtig für dessen Basisaktivierung. Die zweite SP-1-Bindestelle stromabwärts des Transkriptionsstarts stellte sich als essentiell für die Basisaktivierung des LANAp heraus.

#### **4.4 Einfluss der Expression von genomischem Ad5 E1A auf die Aktivität des LANAp und seiner Derivate**

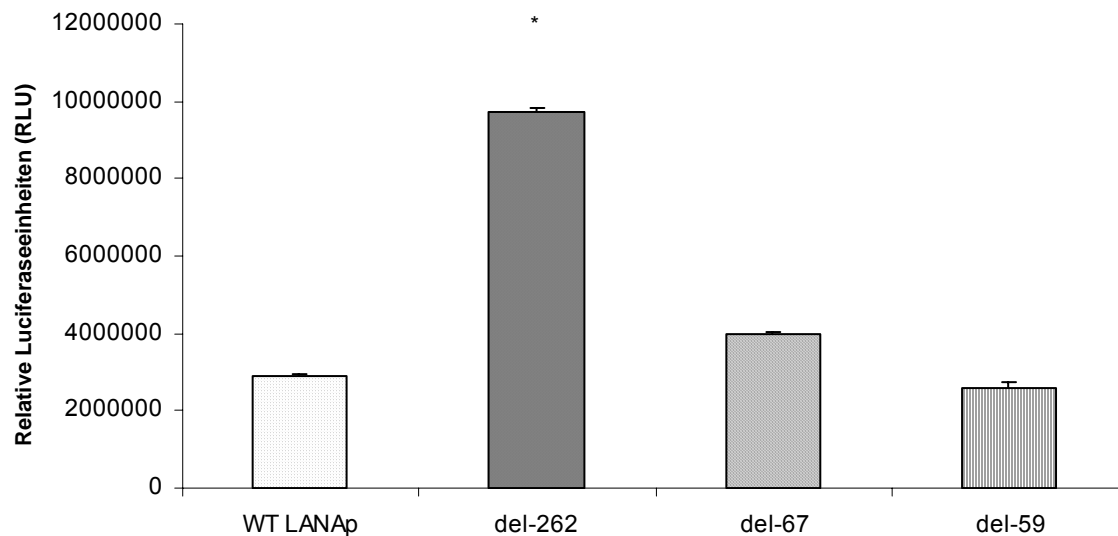
Nachdem zunächst die Funktionalität der Promotorkonstrukte überprüft wurde und eine ausreichende Basisaktivierung gezeigt werden konnte, sollte untersucht werden, ob E1A LANAp regulieren kann. Dies wurde zunächst in HEK293-Zellen überprüft. Die Humane Embrionale Nierenkarzinomzelllinie HEK293 wurde mittels Scherkraft mit Fragmenten von Ad5-DNA transformiert. Insgesamt betrug die mittlere Größe aller DNA-Fragmente nach der Scherung nur noch ein Drittel des viralen Genoms.

Einer der transformierten Zellklone, die dabei erhalten wurden, führte zu der Etablierung der 293-Zelllinie, mit den Genen E1A und E1B. Es wird angenommen, dass darum alle fünf von E1A kodierten Proteine exprimiert werden. Sicher ist jedoch, dass zumindest die beiden großen E1A-Proteine exprimiert werden (Abb. 13), die sowohl für die transformierenden als auch Apoptose-induzierenden Eigenschaften von E1A ausreichend sind.



**Abb. 13: Western-Blot-Analyse der Expression der E1A-Proteine.** Die beiden großen E1A-Proteine (289R und 243R) sind als deutliche Banden zu erkennen (ca. 43 kDa und 38 kDa). Ob es sich bei den unteren Banden (ca. 32 kDa, ca. 30 kDa und ca. 26 kDa) um die drei kleinen E1A-Proteine (217R, 171R und 55R) oder um Artefakte handelt, konnte hier nicht abschließend geklärt werden. Die Membran wurde mit einem primären Antikörper inkubiert, welcher die Ad2 und Ad5 E1A-Proteine detektieren konnte. In der Spur M wurden die Banden des verwendeten Proteinmarker SeeBlue Plus2 eingezeichnet.

Um zu überprüfen, welchen Einfluss die E1A-Proteine auf die Regulation des LANAp haben, wurden die Promotorkonstrukte, die das Reportergen Luciferase enthalten, in HEK293-Zellen transfiziert und mittels Luciferase-Assay analysiert.

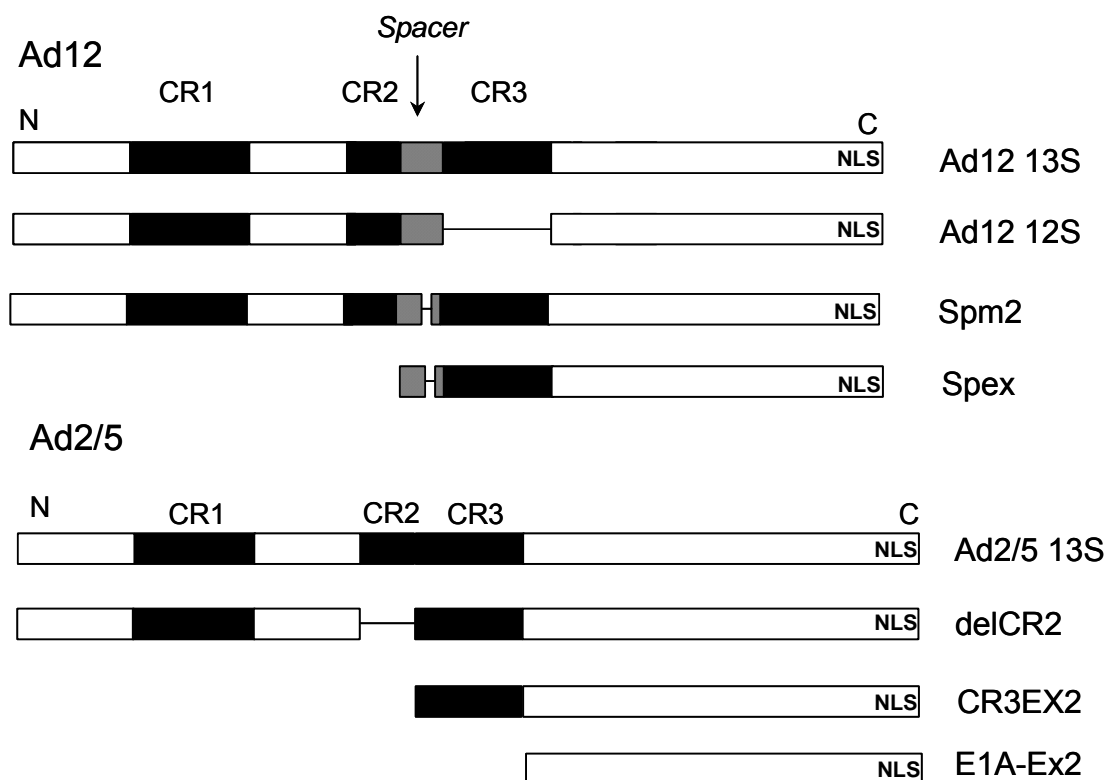


**Abb. 14: Einfluss der Ad5 E1A-Proteine auf die Aktivität der verschiedenen Konstrukte des LANAp in HEK293-Zellen.** Verschiedene LANAp-Luciferase-Reporterkonstrukte in HEK293-Zellen wurden transfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h nach Transfektion gemessen. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte und die mittleren Standardabweichungen eines repräsentativen Experimentes in Dreifachbestimmung. Der Stern zeigt eine errechnete Signifikanz an.

In den HEK293-Zellen zeigt der del -262-Promotor die stärkste Aktivierung. Auch das del -67-Promotorkonstrukt wurde stärker aktiviert als der WT LANAp, die Aktivierung ist aber etwa um die Hälfte schwächer als die des del -262-Konstrukts. Der del -59-Promotor wurde von allen Promotorkonstrukten, die in die HEK293-Zellen transfiziert wurden, am schwächsten aktiviert. Das hier gefundene Aktivierungsmuster von LANAp und seiner Deletionsmutanten durch die beiden großen E1A-Proteine war analog den bereits gezeigten Ergebnissen der Basisaktivierung in der Melanomzelllinie MV3. Jedoch konnte in den HEK293-Zellen eine stärkere Aktivierung (25-fach) beobachtet werden, insbesondere für den del-262-Promotor, der mit 9,5 Millionen RLU (Relative Luciferaseeinheiten) ca. 38-fach gegenüber der Basisaktivierung aktiviert wurde. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der LANAp durch E1A reguliert bzw. aktiviert wird.

#### 4.5 Für Regulationsanalysen verwendete E1A-Konstrukte

Nachdem in den HEK293-Zellen, die die beiden großen E1A-Proteine exprimieren, gezeigt wurde, dass LANAp durch E1A-Proteine aktiviert wird, sollten im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit weitere Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses der Expression durch die folgenden E1A-Konstrukte auf die Aktivität von LANAp untersucht werden. Dazu wurden E1A-Konstrukte verwendet (Abb. 15), bei denen funktionelle Domänen deletiert wurden. Diese Deletionsmutanten sollten Aufschluss darüber geben welche Regionen von E1A an der Regulation des LANAp beteiligt sind. Für den hTERT-Promotor wurde dies bereits beschrieben (Kirch *et al.*, 2002).

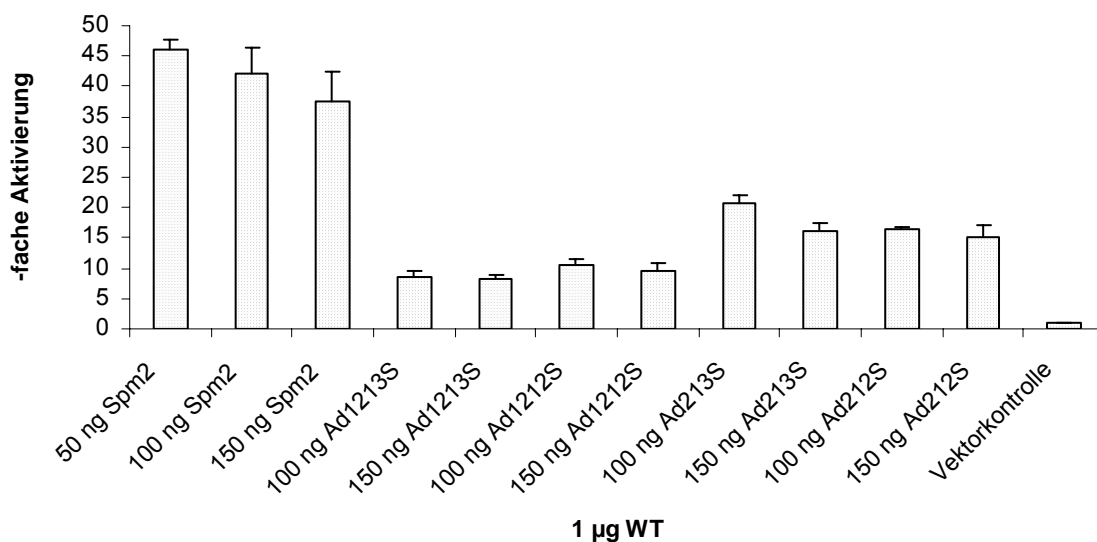


**Abb. 15: Diagramm der wildtyp und der transformationsdefekten Ad12 und Ad2/5 E1A-Proteine.** Der transformationsdefekte „Spacer“-Mutante 2 (Spm2) (Kirch *et al.*, 2002) fehlen sechs konsekutive Alaninreste in dem für Ad12 E1A typischen Spacer. Der Aufbau aller anderen Mutanten ist wie in der Abbildung angegeben. NLS: Nukleäre Lokalisationssequenz, CR1/2/3: Konservierte Region 1,2,3.

## 4.6 Einfluss der Expression verschiedener E1A-Wildtypen und E1A-Deletionsmutanten auf die Aktivität von LANAp-Konstrukten in der Melanomzelllinie MV3

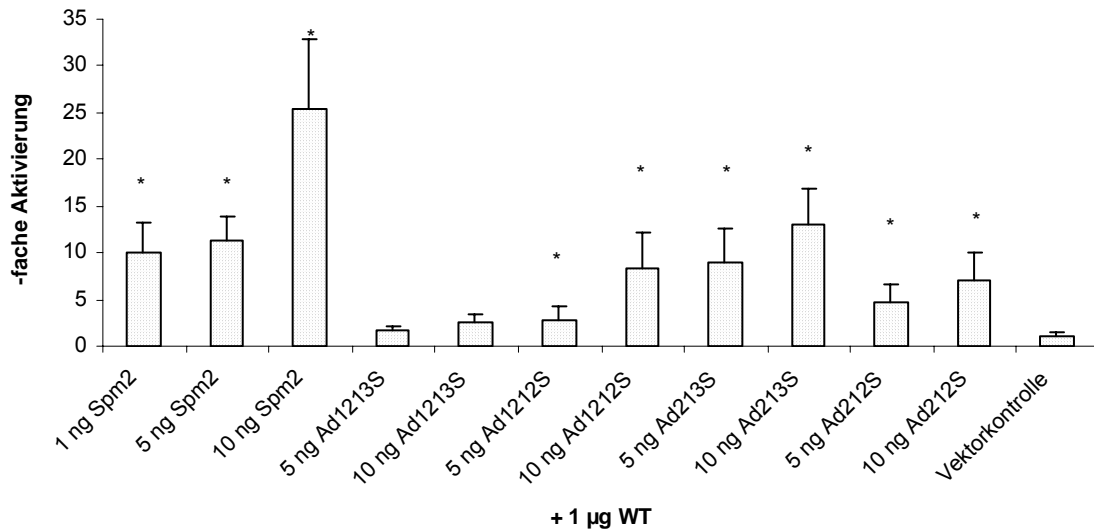
### 4.6.1 Einfluss von Ad12- und Ad2-E1A-Konstrukten auf die Aktivität des WT LANAp

Um zunächst den Einfluss der verschiedenen WT E1A-Deletionsmutanten auf den WT LANAp zu überprüfen, wurden die cDNAs der E1A-Konstrukte (Spm2-Mutante, Ad12 13S und 12S, Ad2 13S und 12S) mit dem LANAp-Reportkonstrukt in die Melanomzelllinie MV3 kotransfiziert und anschließend ihre biologische Aktivität über die Expression des Luciferase-Gens ausgewertet. Die Ergebnisse sind in der Abb. 16 gezeigt.



**Abb. 16: Quencheffekt der Aktivität des LANAp in Abhängigkeit der transfizierten Menge von E1A-cDNA in MV3-Zellen.** In MV3-Zellen wurden das WT-LANAp mit der Spm2-Mutante bzw. mit Ad12 oder Ad2 13S bzw. 12S kotransfiziert. Es wurden hierbei cDNA-Mengen von 50 ng – 150 ng E1A transfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h nach Transfektion gemessen. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte und die mittlere Standardabweichung eines Experiments in Dreifachbestimmung relativ zu den Vektorkontrollen.

Bei allen transfizierten E1A-Konstrukten wurde ab einer bestimmten cDNA-Menge (hier 50 ng) ein deutlicher Quencheffekt beobachtet. Mit zunehmender Menge an transfizierter E1A-cDNA nahm die Aktivität des WT LANAp ab.



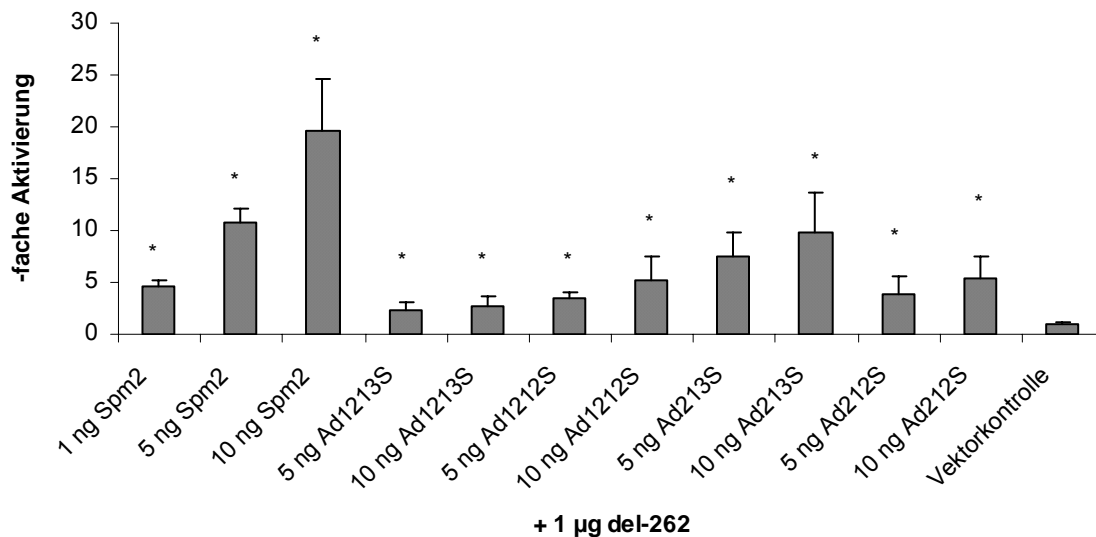
**Abb. 17: Einfluss der transfizierten Spm2-Mutante, der Ad12 und Ad2 13S und 12S auf die Aktivität des WT LANAp in MV3-Zellen.** In MV3-Zellen wurden das WT-LANAp mit der Spm2-Mutante bzw. mit Ad12 oder Ad2 13S bzw. 12S kotransfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h nach Transfektion gemessen. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte und die mittlere Standardabweichung eines repräsentativen Experimentes in Neunfachbestimmung relativ zu den Vektorkontrollen. Die Sterne zeigen signifikante Unterschiede an;  $p < 0,005$ .

Wegen des oben gezeigten Quencheffektes bei zu hohen cDNA-Mengen von E1A (Abb. 16) wurden hier geringere Mengen an DNA (1 ng – 10 ng) transfiziert (Abb. 17). Bei allen E1A-Konstrukten war mit zunehmender DNA-Menge eine Erhöhung der Aktivität des WT LANAp-Promotors zu beobachten. Die Spm2-Mutante war in der Lage, den WT-Promotor am stärksten zu aktivieren (bis ca. 25-fach). Sowohl die Ad2 13S als auch die Ad2 12S aktivierten den WT-LANAp ca. 5- bis 13-fach, wobei die Ad2 13S den Promotor stärker aktivieren konnte als die Ad2 12S. Auch bei der Ad12 12S war eine Aktivierung des WT LANAp zu erkennen, wobei dieses E1A-Konstrukt eine schwächere Aktivierung zeigte als alle anderen aktivierenden E1A-Konstrukte. Im Gegensatz zu der Ad12 13S zeigten die Spm2-Mutante, Ad12 12S, Ad2 13S und 12S eine signifikante Aktivierung des WT-LANAp. Die Ad12 13S konnte den WT LANAp nur minimal aktivieren.

Folglich konnte gezeigt werden, dass der WT LANAp durch E1A aktiviert wird, insbesondere durch die Spm2-Mutante.

#### 4.6.2 Einfluss von Ad12-E1A, Ad2 E1A und der Spm2-Mutante auf die Aktivität des del -262-LANAp-Konstrukts

Weiterhin sollte untersucht werden, ob sich der Einfluss der Spm2-Mutante, Ad12 und Ad2 13S bzw. 12S auf die Aktivität der in Richtung des Transkriptionsstarts verkürzten Deletionsmutanten des LANAp ändert. Daher wurde der del -262-Promotor entweder mit der Spm2-Mutante, Ad12 oder Ad2 13S bzw. 12S in die Melanomzelllinie MV3 kotransfiziert und seine Aktivität nach 48 h mittels Luciferase-Assay analysiert



**Abb. 18: Effekt der Kotransfektion der Spm2-Mutante, Ad12 und Ad2 13S bzw. 12S und dem del -262-Promotors in MV3-Zellen.** In MV3-Zellen wurden das del -262-Promotor-Luciferase-Reporterkonstrukt von HHV-8 mit der Spm2-Mutante bzw. mit Ad12 oder Ad2 13S bzw. 12S kotransfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h nach Transfektion gemessen. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte und die mittlere Standardabweichung eines repräsentativen Experimentes in Neunfachbestimmung relativ zu den Vektorkontrollen. Die Sterne zeigen die errechnete Signifikanz an;  $p < 0,005$ .

Die Aktivierung des del -262-Promotorkonstruktes durch die Spm2-Mutante, Ad12 und Ad2 13S als auch 12S war in etwa vergleichbar mit dem WT LANAp (Abb. 17). Auch hier war wieder der starke Anstieg der Aktivität des del -262-Promotors zu erkennen, wobei das Promotorkonstrukt hier nur ca. 20-fach aktiviert wurde. Weiterhin konnte Ad2 13S den del -262-Promotor bis ca. 10-fach aktivieren. Auch

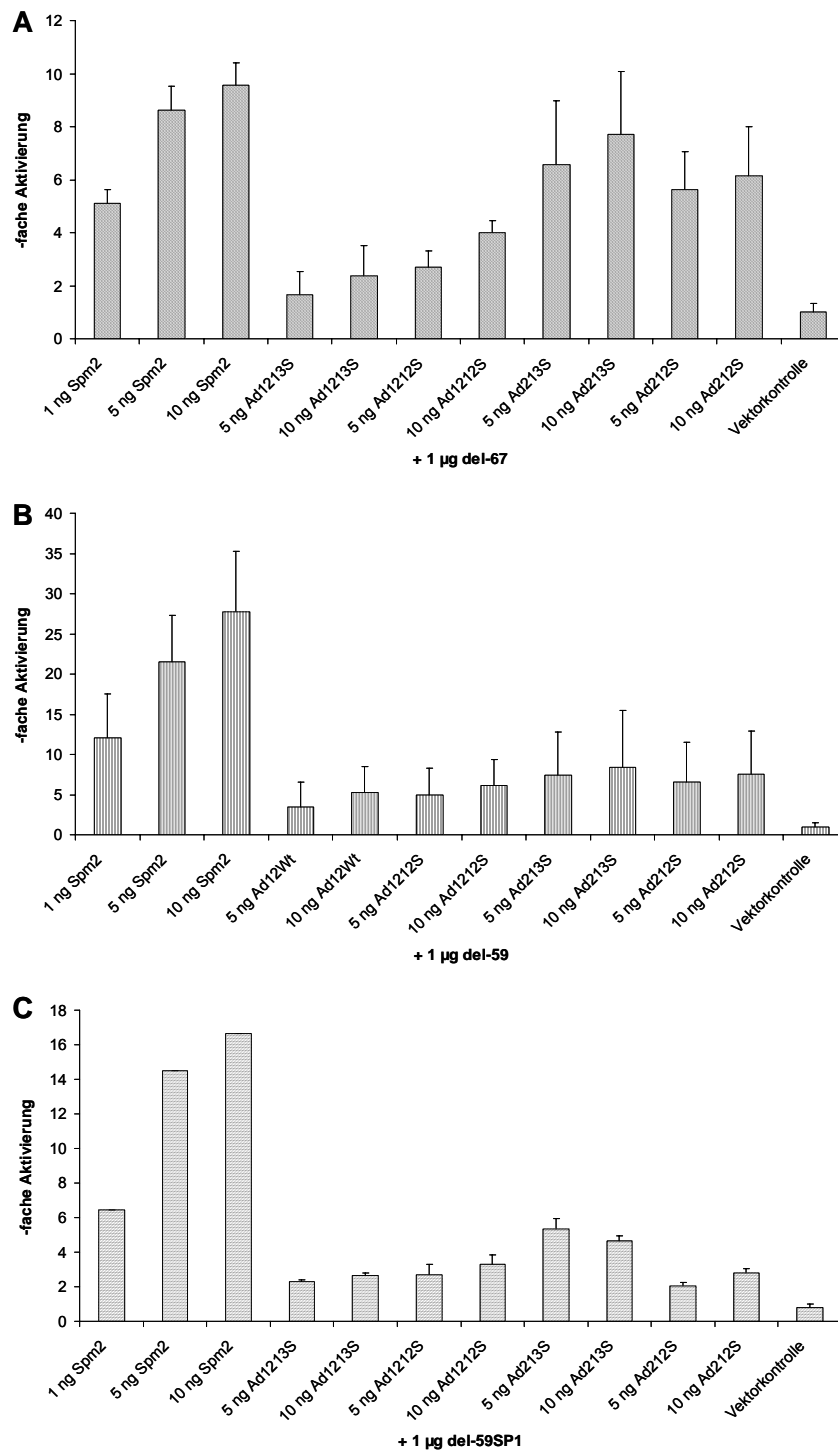
Ad2 12S und Ad12 13S sowie 12S waren in der Lage den del –262-Promotor zu aktivieren.

Auch der del –262-Promotor wird durch E1A reguliert bzw. aktiviert. Anders als bei dem WT LANAp waren alle kotransfizierten E1A-Konstrukte in der Lage, das del –262-Promotorkonstrukt signifikant zu aktivieren, wenngleich auch alle E1A-Konstrukte den del –262 Promotor schwächer aktivierten als den WT LANAp. Nach den Voruntersuchungen in den HEK293-Zellen wäre allerdings zu erwarten gewesen, dass E1A den del –262-Promotor signifikant stärker aktiviert als den WT LANAp. Allerdings konnte auch hier die Spm2-Mutante den Promotor am stärksten von allen verwendeten E1A-Konstrukten aktivieren.

#### **4.6.3 Einfluss von Ad12 E1A, Ad2 E1A und der Spm2-Mutante auf die Aktivität weiterer LANAp-Konstrukte**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sowohl der WT LANAp als auch der del-262-Promotor durch E1A aktiviert wird, sollte untersucht werden, ob der Einfluss der Spm2-Mutante, Ad12 und Ad2 13S bzw. 12S einen Unterschied in Bezug auf die Aktivierung des LANAp zeigt, wenn bei diesem weitere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren deletiert werden.

Daher wurden die zuvor genannten Mutanten von LANAp, bei denen jeweils mehrere Basenpaare in Richtung des Transkriptionsstarts deletiert wurden, mit den oben angegebenen E1A-Konstrukten in die Melanomzelllinie MV3 kotransfiziert. Nach 48 h erfolgte die Auswertung mittels Luciferase-Assay.



**Abb. 19:** Einfluss der Spm2-Mutante, der Ad12 und Ad2 sowohl 13S als auch 12S auf die Aktivität des del-67-Promotors (A), des del-59-Promotors (B) und des del-59-SP1-Promotors (C) von HHV-8 in MV3-Zellen. In MV3-Zellen wurden das del-67-Promotor-Luciferase-Reporterkonstrukt (A), das del-59-Promotor-Luciferase-Reporterkonstrukt (B) oder das del-59-SP1-Promotor-Luciferase-Reporterkonstrukt (C) von HHV-8 mit der Spm2-Mutante bzw. Ad12 oder Ad2 13S bzw. 12S kotransfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h nach Transfektion gemessen. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte und die mittlere Standardabweichung eines repräsentativen Experimentes in Sechsfachbestimmung relativ zu den Vektorkontrollen.

Der Effekt der E1A-Konstrukte auf die Aktivität des del-67-, des del-59- und des del-59SP1-Promotors war in etwa vergleichbar mit den zuvor bei dem WT LANAp und dem del -262-Promotor beobachteten Ergebnissen. In allen drei Abbildungen ist ein starker Anstieg der Aktivität der drei Promotorkonstrukte durch die Spm2-Mutante zu verzeichnen (wenn auch unterschiedlich stark). Der del -67-Promotor wurde von der Spm2-Mutante nur ca. 10-fach aktiviert und ist damit das schwächste von allen verwendeten Promotorkonstrukten. Die stärkste Aktivierung durch die Spm2-Mutante zeigte der del -59-Promotor (bis ca. 27-fach). Der del -59-SP1-Promotor wurde ca. 17-fach aktiviert.

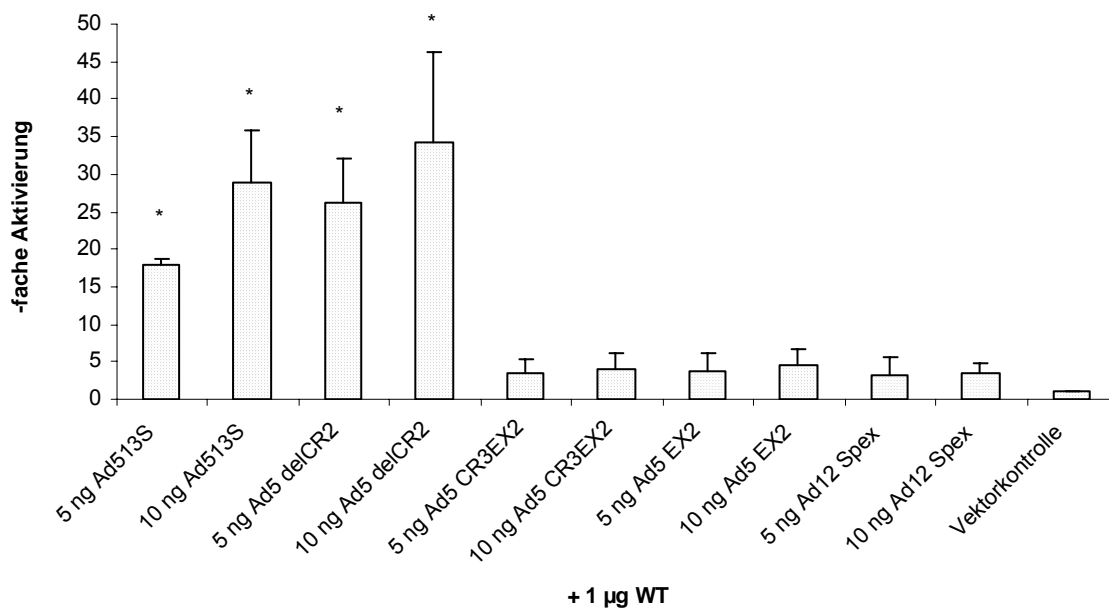
Ad2 war in der Lage, die Promotorkonstrukte am zweitstärksten zu aktivieren. Die 13S aktivierte den del -67-Promotor und den del -59-Promotor bis ca. 8-fach und die 12S bis ca. 6-fach. Am schwächsten aktiviert wird der del -59-SP1-Promotor sowohl von der 13S (ca. 6-fach) als auch von der 12S (ca. 3-fach).

Ad12 konnte den del -67- und den del -59-SP1-Promotor nicht aktivieren, wobei die Ad12 12S den del-67-Promotor bis ca. 4-fach aktivierte. Der del -59-Promotor hingegen wurde von der Ad12 13S (ca. 5-fach) und von der Ad12 12S (ca. 6-fach) aktiviert. Also war Ad12 in der Lage, den del -59-Promotor am stärksten von allen hier untersuchten LANAp-Derivaten zu aktivieren, allerdings war die Induktion der Aktivität der LANAp-Deletionsmutanten durch Ad12 von allen verwendeten E1A-Konstrukten am schwächsten.

Alle hier verwendeten LANAp-Derivate wurden durch E1A reguliert und bei allen Promotorkonstrukten war die Aktivierung durch die Spm2-Mutante am stärksten. Das am stärksten durch die Spm2-Mutante aktivierte Promotorkonstrukt war der del-59-Promotor, der etwa gleich stark durch die Spm2-Mutante aktiviert wurde wie der WT LANAp. Am schwächsten wurde der del-67-Promotor durch die Spm2-Mutante aktiviert. Dagegen wurde der del-59SP1-Promotor wesentlich stärker durch die Spm2-Mutante aktiviert. Da die Spm2-Mutante nicht mehr in der Lage ist an pRb zu binden, scheint diese Region für die Aktivierung des LANAp durch E1A nicht essentiell zu sein.

#### 4.6.4 Einfluss von Ad5 E1A und Ad12 E1A-Konstrukten auf die Aktivität des WT LANAp

Da gezeigt werden konnte, dass WT-E1A und die Spm2-Mutante einen Einfluss auf die Regulation des LANAp und seiner Derivate hatte, sollte weiterhin überprüft werden, welche Bereiche des E1A-Proteins für die Aktivierung des LANAp durch E1A verantwortlich sind. Außerdem sollte untersucht werden, ob der Einfluss auf die Aktivität des WT LANAp durch Deletionsmutanten von E1A verändert wird. Hierzu wurde die Ad5 13S und verschiedene Mutanten, bei denen Bereiche in Richtung des C-Terminus deletiert wurden, mit dem WT-Promotor in die Melanomzelllinie MV3 kotransfiziert.



**Abb. 20: Einfluss von Ad5 13S, Ad5 E1A-Deletionsmutanten und der Spex auf die Aktivität des WT LANAp in der Melanomzelllinie MV3.** In MV3-Zellen wurden der WT-LANAp mit der Ad5 E1A 13S, mit verschiedenen Ad5 E1A-Mutanten oder mit der -Spex kotransfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h nach Transfektion gemessen. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte und die mittlere Standardabweichung eines repräsentativen Experiments in Neunfachbestimmung relativ zu den Vektorkontrollen. Die Sterne zeigen die errechnete Signifikanz an;  $p < 0,005$ .

Der WT LANAp wurde sowohl von Ad5 13S als auch von der delCR2 stark aktiviert (ca. 30- bzw. ca. 35-fach). Die Aktivierung durch beide E1A-Konstrukte erwies sich als signifikant, wobei die delCR2 den Promotor am stärksten aktivierte.

Alle anderen Deletionsmutanten von E1A waren kaum noch in der Lage, den WT LANAp zu aktivieren.

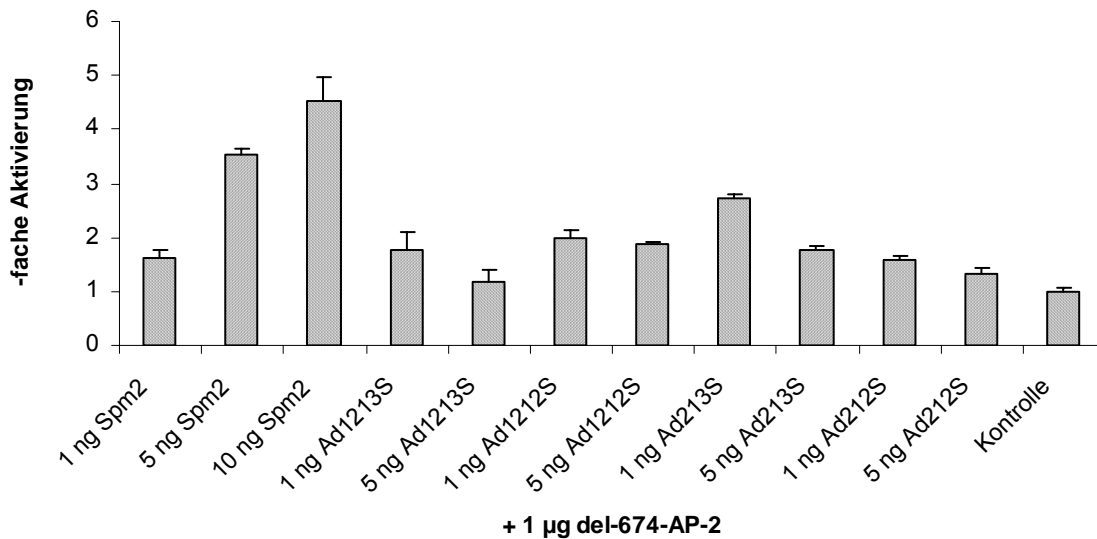
Bei der delCR2, die den Promotor am stärksten aktivierte, wurde die konservierte Region 2 (CR2, s. Abb. 15) deletiert. Diese Mutante besitzt dadurch einen intakten N-Terminus von AS 1 – AS 119.

Die Ad5 13S konnte den LANAp wesentlich stärker aktivieren (Abb. 20) als die Ad2 13S (Abb. 17). Dies ist insofern verwunderlich, da Ad2 E1A und Ad5 E1A weitgehend identisch sind.

In Bezug auf die E1A-Mutanten waren nur diejenigen mit einem intakten N-Terminus von AS 1 – AS 119 in der Lage, LANAp zu aktivieren. Die anderen E1A-Mutanten, die den Promotor kaum noch aktivieren konnten, tragen verschiedene Deletionen innerhalb des N-Terminus. Auch für Ad12 E1A konnte gezeigt werden, dass durch eine Deletion im N-Terminus der LANAp nicht mehr von Ad12 E1A aktiviert werden konnte. Die pRb-Bindungsregion der E1A-Proteine ist nicht essentiell für die Aktivierung des LANAp durch E1A.

#### **4.6.5 Einfluss von Ad12 E1A, Ad2 E1A und der Spm2-Mutante auf die Aktivität des del –263-AP-2-Promotors**

Hier konnte gezeigt werden, dass LANAp-Promotor durch E1A aktiviert wird und die basale Aktivität nach Deletion der letzten AP-2-Bindungsstelle stark abnimmt (Abb. 12). E1A-Proteine interagieren mit dem Transkriptionsfaktor AP-2, wie dies weiter oben bereits beschrieben wurde, und reguliert dessen Zielgene. Weiterhin trägt der AP-2-Promotor einige Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-2, genauso wie der LANAp. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die Regulation des AP-2-Promotors durch E1A überprüft werden. Dazu wurde der AP-2-Promotor (Abb. 7) mit der Spm2-Mutante, Ad12 E1A-cDNA und Ad2 13S oder 12S kotransfiziert und die Expression des Reporterergenproduktes Luciferase gemessen.



**Abb. 21: Einfluss der Spm2-Mutante, Ad12 E1A und Ad 13S sowie 12S auf die Aktivität des del –653-AP-2-Promotors in MV3-Zellen.** Das del- 653-AP-2-Promotor-Luciferase-Reporterkonstrukt wurde mit der Spm2-Mutante bzw. mit Ad12 E1A-cDNA oder Ad2 13S bzw. 12S in MV3-Zellen kotransfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h nach Transfektion gemessen. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte und die mittlere Standardabweichung eines repräsentativen Experimentes in Dreifachbestimmung relativ zu den Kontrollen.

Trotz der wesentlich höheren Basisaktivität des AP-2-Promotors gegenüber dem LANap (Abb. 12), zeigte sich nur eine sehr schwache Aktivierung durch E1A. Wie auch bei dem LANap wurde der AP-2-Promotor am stärksten durch die Spm2-Mutante aktiviert, jedoch war diese Aktivierung stark erniedrigt (ca. 5-fach) gegenüber der Aktivierung des LANap und seiner Derivate durch Spm2-Mutante (Abb. 17, Abb. 18 und Abb. 19). Alle weiteren verwendeten E1A-Konstrukte konnten den Promotor maximal 3-fach aktivieren (Ad2 13S). Die Ad12 12S konnte den AP-2-Promotor noch ca. 2-fach aktivieren, wohingegen die Ad12 13S und die Ad2 12S kaum noch in der Lage waren, den Promotor zu regulieren.

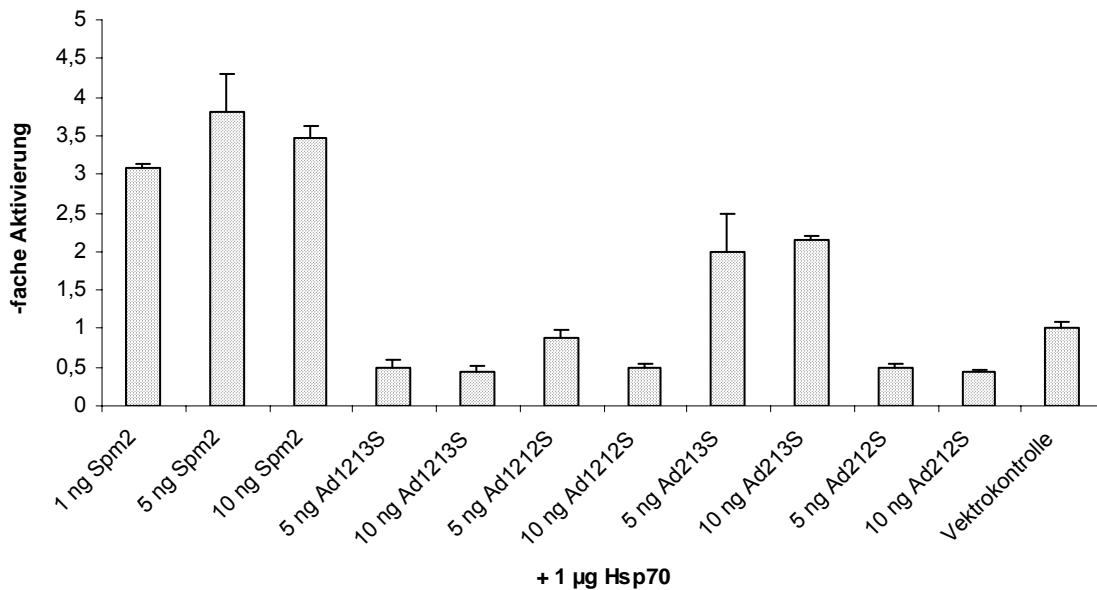
Trotz der niedrigen cDNA-Menge war durch alle hier verwendeten E1As ein leichter Quencheffekt zu erkennen, d.h. dass transkriptionelle Kofaktoren durch hohe Mengen an E1A-Proteinen durch diese abgefangen werden und daher nicht mehr an den Promotor binden können (Kirch *et al.*, 2002).

Der AP-2-Promotor wurde trotz seiner hohen Basisaktivität wesentlich schwächer durch E1A aktiviert als der LANap (Vergleich: Abb. 17). Aber auch der del-653-Promotor wurde am stärksten durch die Spm2-Mutante aktiviert.

#### 4.6.6 Einfluss von Ad12-, Ad2-E1A und der Spm2-Mutante auf die Aktivität des *Hsp70*-Promotors

Nachdem eine hohe Aktivierung des LANAp durch E1A in den MV-3-Zellen beobachtet werden konnte (Abb. 17), die aber nicht in den HHV-8-positiven BC-3-Zellen bestätigt wurde (Abb. 26), sollte die Regulation eines anderen Promotors durch E1A überprüft werden. Dazu wurde hier der humane *Hsp70*-Promotor verwendet. Die Regulation des *Hsp70*-Promotors durch E1A-Proteine wurde bereits von Ström *et al.* (1998) beschrieben. Die für das Transaktivierungspotential benötigten Regionen der E1A-Proteine sind die Transaktivierungsdomäne CR3 und die im Exon 2 befindliche Region AR1 (auxilliary region 1) (Ström *et al.*, 1998). Die CR1 ist zusätzlich für die Rekrutierung der E1A-Proteine an den Promotor notwendig (Ström *et al.*, 1998). So bot die Untersuchung der Aktivierbarkeit des *Hsp70*-Promotors durch die verschiedenen E1A-Konstrukte die Möglichkeit, auch die Aktivierbarkeit des LANAp und seiner Deletionsmutanten sowie die Aktivierbarkeit des AP-2-Promotors durch E1A zu vergleichen.

Die E1A-Konstrukte und das *Hsp70*-Luciferase-Reporterplasmid wurden in MV3-Zellen kotransfiziert.



**Abb. 22: Einfluss von E1A auf die Aktivität des *Hsp70*-Promotors in MV3-Zellen.** In MV3-Zellen wurden das *Hsp70*-Promotor-Luciferase-Reporterkonstrukt mit der Spm2-Mutante bzw. mit Ad12 E1A-cDNAs oder Ad2 13S bzw. 12S kotransfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h nach Transfektion gemessen. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte die mittlere Standardabweichung eines repräsentativen Experimentes in Dreifachbestimmung relativ zu den Kontrollen.

Es konnte eine sehr hohe Basisaktivität des *Hsp70*-Promotors gezeigt werden (Abb. 12). Die Aktivierung des Promotors durch E1A fiel jedoch, verglichen mit dem LANAp, sehr schwach aus.

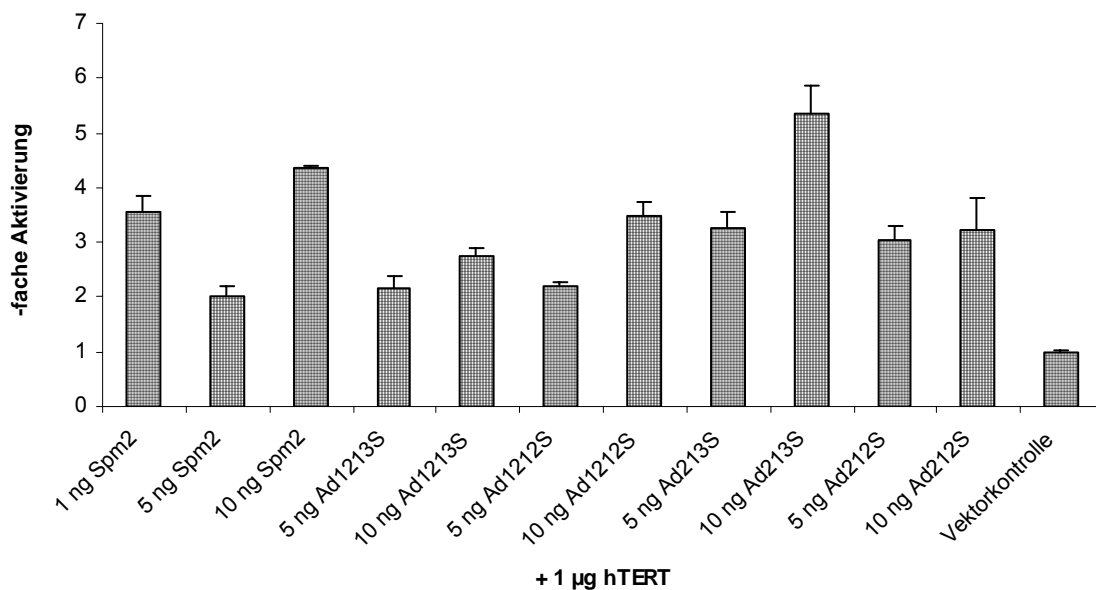
Die Spm2-Mutante konnte den *Hsp70*-Promotor in der Melanomzelllinie MV3 lediglich ca. 4-fach aktivieren und Ad2 13S aktivierte den Promotor ca. 2-fach. Alle anderen E1A-Konstrukte waren nicht in der Lage den Promotor zu aktivieren. Die Ad12 12S zeigte eine leichte Suppression des Promotors.

Trotz der niedrigen DNA-Konzentrationen war auch hier, außer bei der Kotransfektion mit der Ad2 13S, ein leichter Quencheffekt zu erkennen.

Die Aktivierung des *Hsp70*-Promotors durch E1A war in etwa vergleichbar mit der Aktivierung des AP-2-Promotors durch E1A. Der *Hsp70*-Promotor wurde ebenfalls, wie der AP-2-Promotor (Abb. 21), nur sehr schwach durch E1A aktiviert. Die Spm2-Mutante konnte auch den *Hsp70*-Promotor von allen hier verwendeten E1A-Deletionsmutanten am stärksten aktivieren, wenn diese Aktivierung durch die Spm2-Mutante auch wesentlich schwächer war als die Aktivierung des LANAp durch die Spm2-Mutante (Vergleich: Abb. 17).

#### 4.6.7 Einfluss von Ad12 E1A, Ad2 E1A und der Spm2-Mutante auf die Aktivität des humanen TERT-Promotors

Da sowohl der AP-2-Promotor als auch der *Hsp70*-Promotor nur sehr schwach durch E1A aktiviert werden konnten, sollte zusätzlich die Aktivität des humanen TERT-Promotors (hTERT), durch E1A überprüft werden. Die Expression der Spm2-Mutante wird von diesem Promotor kontrolliert und die Spm2-Mutante hat sich als potenter Aktivator des LANAp herausgestellt. Weil Kirch *et al.* (2002) bereits in der Melanomzelllinie BLM eine Aktivierung des hTERT-Promotors durch E1A zeigten, sollte im Zuge dieser Arbeit die Regulation des hTERT-Promotors durch E1A in den MV-3-Zellen überprüft werden. Dazu wurde der hTERT-Promotor (Kirch *et al.*, 2002) mit Spm2-Mutante, Ad12 E1A-cDNAs sowie Ad2 13S und 12S in die Melanomzelllinie MV3 kotransfiziert.



**Abb. 23: Einfluss der Spm2-Mutante, der Ad12 E1A und Ad2 13S als auch 12S auf die Aktivität des hTERT-Promotors (Kirch *et al.*, 2002) in MV3-Zellen.** In MV3-Zellen wurden das hTERT-Promotor-Luciferase-Reporterkonstrukt (Kirch *et al.*, 2002) mit der Spm2-Mutante bzw. mit Ad12 E1A-cDNAs oder Ad2 13S bzw. 12S kotransfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h nach Transfektion gemessen. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte und die mittlere Standardabweichung eines repräsentativen Experimentes in Dreifachbestimmung relativ zu den Kontrollen.

Anders als bei den Promotorkonstrukten des LANAp (Vergleich: Abb. 17, Abb. 18, Abb. 19), dem AP-2-Promotor (Abb. 21) und dem *Hsp70*-Promotor (Abb. 22)

aktivierten hier alle E1A-Konstrukte den hTERT-Promotor in etwa gleich stark. Am stärksten war die Ad2 13S in der Lage den Promotor zu aktivieren (ca. 6-fach). Die Spm2-Mutante aktivierte den hTERT-Promotor ca. 5-fach.

Sowohl die Ad12 12S als auch die Ad2 12S konnten den Promotor nur schwach aktivieren und die Ad12 13S ist nicht mehr in der Lage den hTERT-Promotor zu beeinflussen.

In Bezug auf den hTERT-Promotor zeigte sich ein vollkommen anderes Aktivierungsmuster als bei den bisher verwendeten Promotoren LANAp, AP-2 und *Hsp70*. Es zeigten sich kaum Unterschiede in der Stärke der Aktivierung des hTERT-Promotors durch E1A. Im Gegensatz zu den Promotoren LANAp, AP-2 und *Hsp70*, die am stärksten durch die Spm2-Mutante aktiviert wurden, wurde der hTERT-Promotor am stärksten durch Ad2 13S aktiviert.

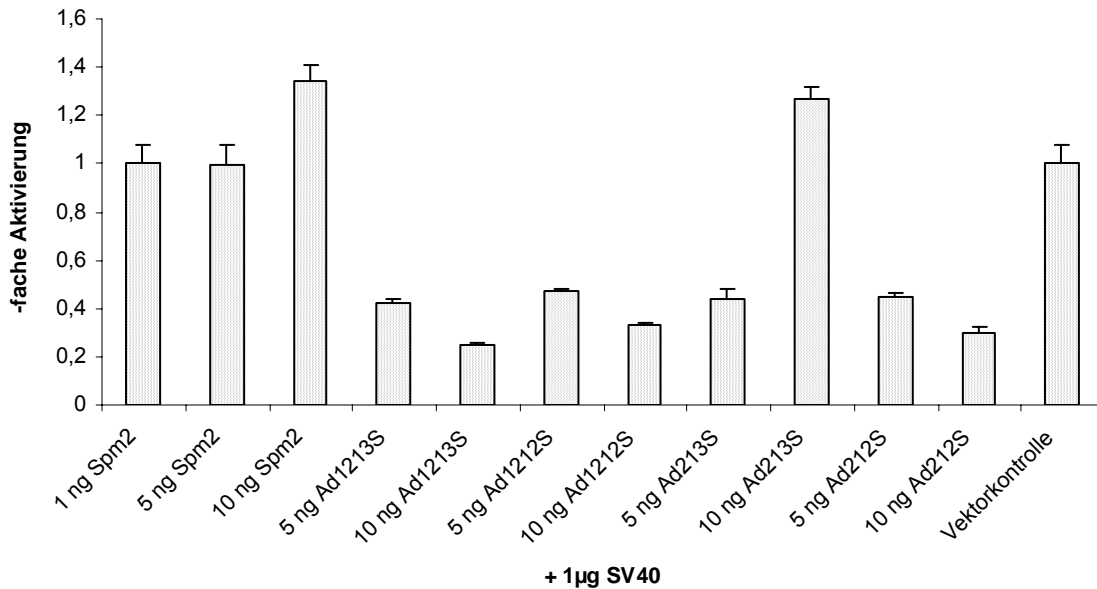
Allerdings konnte auch der hTERT-Promotor trotz seiner hohen Basisaktivierung nur schwach durch E1A aktiviert werden.

Der LANAp trägt sowohl Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor AP-2 als auch für SP1, wohingegen der AP-2-Promotor AP-2-Bindungsstellen trägt. Es wurde keine Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor SP1 beschrieben sind (Creaser *et al.*, 1996). Dagegen tragen der *Hsp70*- (Wilke *et al.*, 2000) und der hTERT-Promotor (Kirch *et al.*, 2002) Bindungsstellen für den SP1-Promotor und es wurden keine Bindungsstellen für AP-2 beschrieben. Deshalb trägt keiner der hier verwendeten Promotoren, mit Ausnahme des LANAp, Bindungsstellen für beide Transkriptionsfaktoren.

#### **4.6.8 Einfluss von Ad12 E1A, Ad2 E1A der Spm2-Mutante auf die Aktivität des SV40-Promotors**

Da der SV40-Promotor/Enhancer von E1A-Proteinen supprimiert wird (Velcich und Ziff, 1985), sollte er als Funktionskontrolle der E1A-Konstrukte dienen. Da sowohl der AP-2- und der *Hsp70*-Promotor als auch der hTERT-Promotor eine hohe basale Aktivität zeigten (Abb. 12) und trotzdem nur schwach von E1A aktiviert wurden (Abb. 21, Abb. 22 und Abb. 23) sollte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die

verwendeten E1A-Konstrukte in der Lage sind, den SV40-Promotor zu supprimieren. Dazu wurden der pGL3-Luciferasekontrollvektor (Promega), der von dem SV40-Promotor kontrolliert wird, mit der Spm2-Mutante, Ad12 E1A-cDNA und Ad2 13S sowie 12S in die Melanomzelllinie MV3 kotransfiziert.



**Abb. 24: Einfluss von E1A auf die Aktivität des SV40-Promotors in MV3-Zellen.** In MV3-Zellen wurden das pGL3-Kontroll-Luciferase-Reporterkonstrukt (Promega), das von dem SV40-Promotor kontrolliert wird, mit der Spm2-Mutante bzw. mit Ad12 E1A-cDNA oder Ad2 13S bzw. 12S kotransfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h nach Transfektion gemessen. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte und die mittlere Standardabweichung eines repräsentativen Experimentes in Dreifachbestimmung relativ zu den Kontrollen.

Hier ist gut zu erkennen, dass die Aktivität des SV40-Promotors überwiegend von den verwendeten E1A-Konstrukten supprimiert wurde. Lediglich die Spm2-Mutante und Ad2 13S hatten keinen Einfluss auf die Aktivität des Promotors. Bei der Ad2 13S erfolgte die Suppression mengenabhängig: 5 ng DNA konnten die Aktivität des SV40-Promotor noch um ca. 60 % supprimieren, wohingegen 10 ng cDNA von Ad2 die Aktivität des Promotors weder supprimieren noch aktivieren konnten. Alle anderen E1A-Konstrukte, die Ad12 13S und 12S sowie die Ad2 12S, supprimierten die Aktivität des SV40-Promotor zwischen 50% und 70%. Die Ad12 12S supprimierte die Aktivität des Promotors nur um 50%, während die Ad12 13S diese um 70% supprimierte.

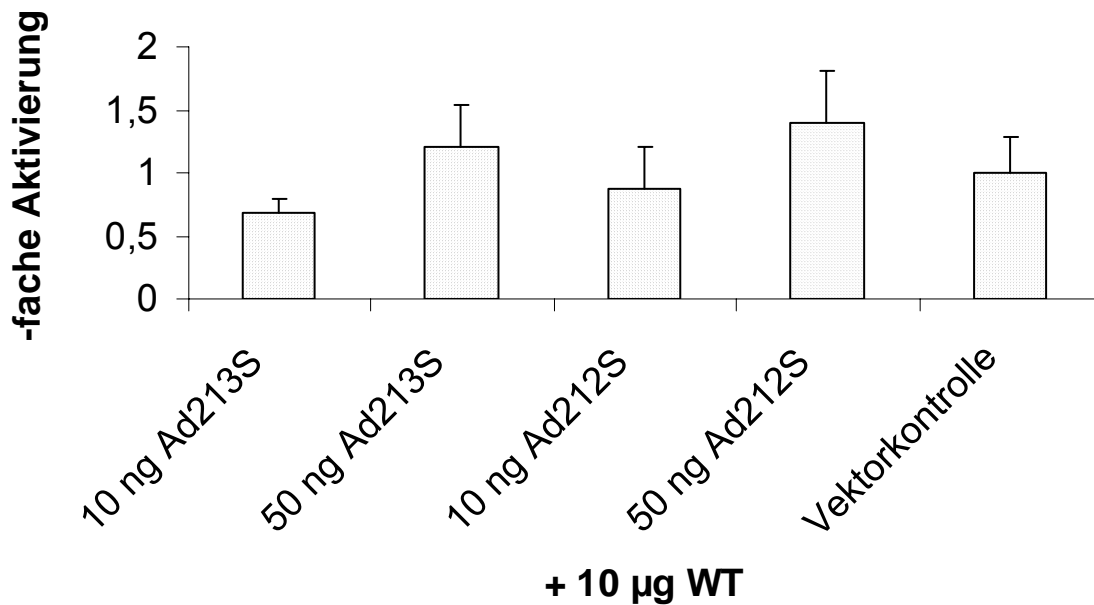
Der SV40-Promotor/Enhancer wurde durch E1A-Wildtyp supprimiert, was darauf schließen lässt, dass die hier verwendeten E1A-Konstrukte funktionell intakt sind. Die

Spm2-Mutante konnte den SV40-Promotor weder aktivieren noch supprimieren, die Spm2-Mutante den LANAp aber stark aktivieren konnte, ist auch bei diesem E1A-Konstrukt von einer intakten Funktion auszugehen.

## **4.7 Einfluss der Expression von Ad2 E1A und der Spm2-Mutante auf die Aktivität von Promotoren in B-Lymphozyten**

### **4.7.1 Einfluss der Expression von Ad2 E1A auf die Aktivität des WT LANAp in der HHV-8-positiven Zelllinie BC-3**

Nachdem in der Melanomzelllinie MV3 gezeigt werden konnte, dass LANAp durch E1A reguliert bzw. aktiviert wird, sollte die Aktivierung von LANAp durch E1A in einer HHV-8-positiven Zelllinie überprüft werden. Für diese Untersuchungen eignete sich die HHV-8-positive Lymphozytenlinie BC-3, da sie effizient zu transfizieren war. Weil Ad2 E1A den WT LANAp in der Melanomzelllinie MV3 am zweitstärksten aktivieren konnte, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob diese Aktivierung auch in der HHV-8-positiven Zelllinie BC-3 bestätigt werden konnte. Dazu wurde der WT LANAp mit Ad2 13S bzw. 12S kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und mittels Luciferase-Assay analysiert.



**Abb. 25: Einfluss der Ad2 13S und 12S auf die Aktivität des WT LANAp in der HHV-8-positiven B-Zelllinie BC-3.** Der LANAp wurde mit Ad2 13S bzw. 12S in BC-3-Zellen kotransfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h nach Transfektion gemessen. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte und die mittlere Standardabweichung eines repräsentativen Experimentes in Dreifachbestimmung relativ zu den Vektorkontrollen.

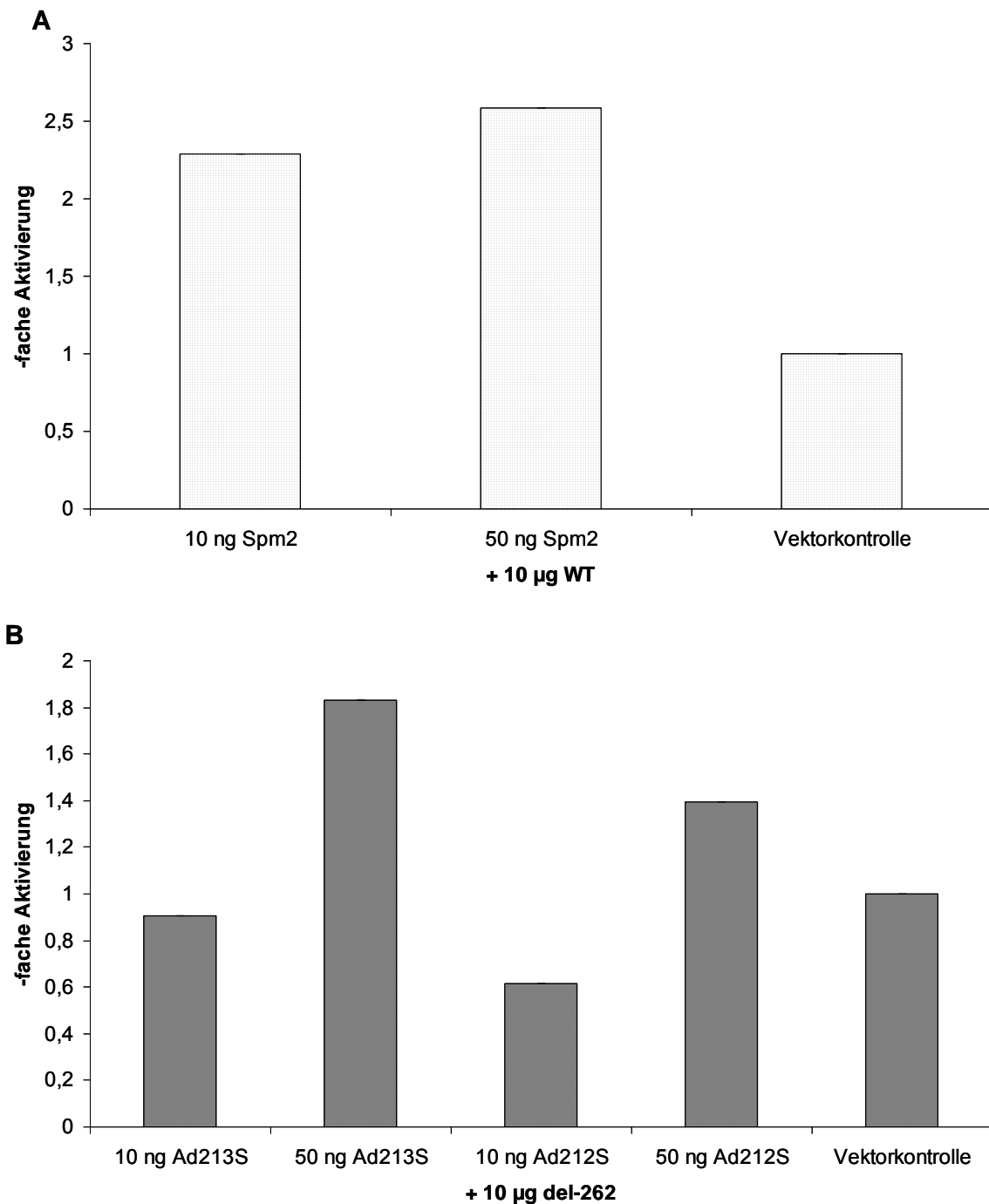
In der Melanomzelllinie MV3 wurde der WT-LANAp durch Ad2 E1A bis zu ca. 13-fach aktiviert (Vergleich: Abb. 17). Im Gegensatz dazu ließ sich in der HHV-8-positiven B-Zelllinie BC-3 keine Aktivierung durch Ad2 E1A feststellen. Die hohe DNA-Menge für den LANAp erklärt sich dadurch, dass im Zuge der Elektroporation eine sehr hohe Zellzahl verwendet wird. Optimalerweise sollte die DNA in mindestens 50 % der Zellen transferiert werden. In Voruntersuchungen wurden die optimalen Elektroporationsbedingungen in Bezug auf DNA-Menge und Zellzahl überprüft. Auch die cDNA-Menge an E1A wurde optimal eingestellt. Bei einer cDNA-Menge über 50 ng konnten Quench-Effekte beobachtet werden.

#### **4.7.2 Einfluss der Expression der Ad12 Spm2-Mutante bzw. von Ad2 E1A auf die Aktivität des LANAp in der HHV-8-positiven Zelllinie BC-3**

Da die Spm2-Mutante den WT-LANAp in MV3-Zellen am stärksten aktivieren konnte (Abb. 17), sollte überprüft werden, ob die Spm2-Mutante den WT-LANAp in der HHV-8-positiven Zelllinie BC-3 aktivieren kann, nachdem festgestellt wurde, dass Ad2 E1A dazu nicht in der Lage waren.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob der del -262-Promotor durch Ad2 E1A aktiviert wird, da der Promotor durch Ad2 E1A bis zu 10-fach in der Melanomzelllinie MV3 aktiviert wurde (Abb. 18).

Der WT LANAp wurde mit der Spm2-Mutante in die BC-3-Zellen kotransfiziert sowie der del -262-Promotor mit Ad2 13S bzw. 12S in die BC-3-Zellen kotransfiziert wurde. Nach jeweils 48 h wurde die Aktivität der Promotor anhand von Luciferase-Assays ermittelt.



**Abb. 26: Einfluss der Spm2-Mutante auf die Aktivität des WT LANAp (A) und Einfluss der Ad2 13S und 12S auf den del -262-HHV-8-Promotor (B) in der HHV-8-positiven B-Zelllinie BC-3.** Der WT-LANAp wurde mit der Spm2-Mutante in BC-3-Zellen kotransfiziert (A). Weiterhin wurde das HHV-8-del-262-Luciferase-Reporterkonstrukt mit Ad2 13S bzw. 12S in BC-3-Zellen kotransfiziert (B). Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h nach Transfektion gemessen. Die gezeigten Werte sind die eines Experimentes in Einfachbestimmung relativ zu den Vektorkontrollen.

Der WT LANAp wurde durch die Spm2-Mutante in den HHV-8-positiven B-Lymphozyten BC-3 nur noch minimal bis ca. 2,5-fach aktiviert (Abb. 26A), im Gegensatz zu den Ergebnissen der Transfektionsexperimente in den MV3-Zellen.

Dort konnte die Spm2-Mutante den LANAp bis ca. 25-fach aktivieren (Abb. 17), also etwa das 10-fache der Aktivierung in den BC-3-Zellen.

Die Ad2 E1A waren ebenfalls kaum in der Lage, den del –262-Promotor in den BC-3-Zellen zu aktivieren. Anders jedoch als bei dem WT-LANAp konnte Ad2 13S den del –262-Promotor dosisabhängig aktivieren. Bei einer DNA-Konzentration von 50 ng wurde der Promotor ca. 2-fach aktiviert (Abb. 26B), wobei die Aktivierung des del –262-Promotors durch die Ad2 13S in den MV3-Zellen mit ca. 10-fach fünfmal so stark war (Abb. 18). Ad2 12S konnte den del-262-Promotor nicht aktivieren.

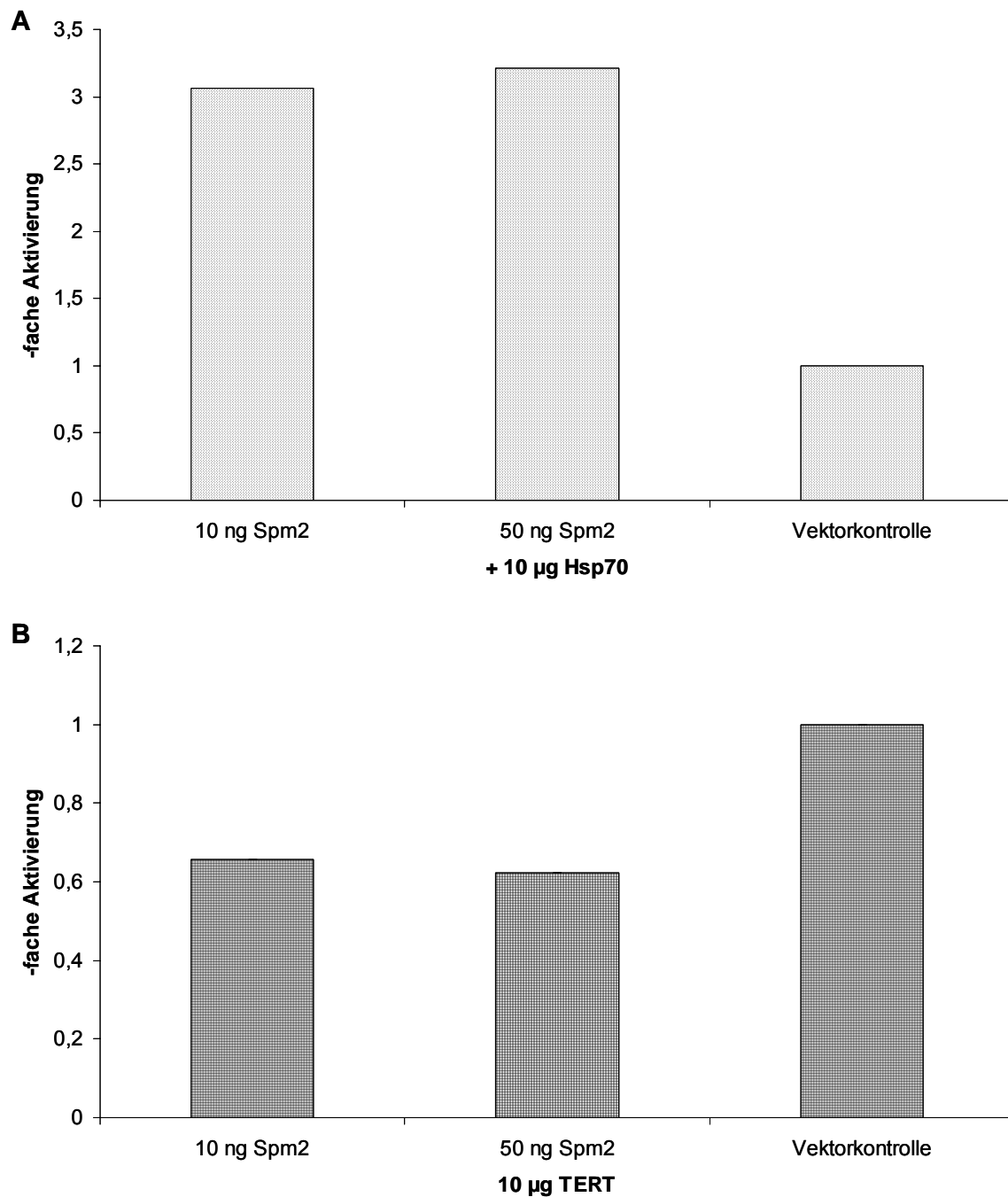
Im Gegensatz zu den Beobachtungen in der Melanomzelllinie MV3 war die Spm2-Mutante nicht in der Lage den LANAp zu aktivieren, noch konnte der del-262-Promotor durch E1A in der HHV-8-positiven Zelllinie aktiviert werden.

Möglicherweise konnte der transfizierte LANAp nicht durch E1A reguliert werden, wegen der Anwesenheit des endogenen LANAp in den HHV-8-positiven BC-3-Zellen. Zudem könnte das Genprodukt des latenten Antigens LANA mit E1A-Proteinen um Bindestellen von Transkriptionsfaktoren konkurrieren, so dass die E1A-Proteine mit diesen nicht interagieren und den LANAp nicht regulieren können.

#### **4.7.3 Einfluss der Expression der Ad12 Spm2-Mutante auf die Aktivität des *Hsp70*- und des humanen TERT-Promotors in der HHV-8-positiven Zelllinie BC-3**

Die Spm2-Mutante konnte den LANAp in der Melanomzelllinie MV3 am stärksten aktivieren (Abb. 17). In der HHV-8-positiven B-Zelllinie BC-3 hingegen konnte keine Aktivierung des LANAp durch E1A beobachtet werden, weder durch die Spm2-Mutante noch durch die Ad2 E1A. Daher sollte nun überprüft werden, ob der endogene LANAp die E1A-Proteine möglicherweise wegfängt und folglich die E1A-Proteine nicht an den transfizierten LANAp binden und diesen nicht aktivieren können. Daher sollte im Zuge dieser Arbeit die Regulation anderer Promotoren durch E1A in den HHV-8-positiven BC-3-Zellen überprüft werden. Dazu wurden sowohl der *Hsp70*-Promotor als auch der hTERT-Promotor (Kirch *et al.*, 2002) mit der Spm2-

Mutante in die B-Lymphozytenlinie BC-3 kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Aktivitäten der Promotoren jeweils mittels Luciferase-Assay bestimmt.



**Abb. 27: Einfluss der Spm2-Mutante auf die Aktivität des Hsp70- (A) und des hTERT-Promotor (B) in der HHV-8-positiven B-Zelllinie BC-3.** Das *Hsp70*- (A) und das hTERT (B; Kirch *et al.*, 2002)-Luciferase-Reporterkonstrukt wurden mit der Spm2-Mutante in BC-3-Zellen kotransfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h nach Transfektion gemessen. Die gezeigten Werte sind die eines repräsentativen Experimentes in Einfachbestimmung relativ zu den Vektorkontrollen.

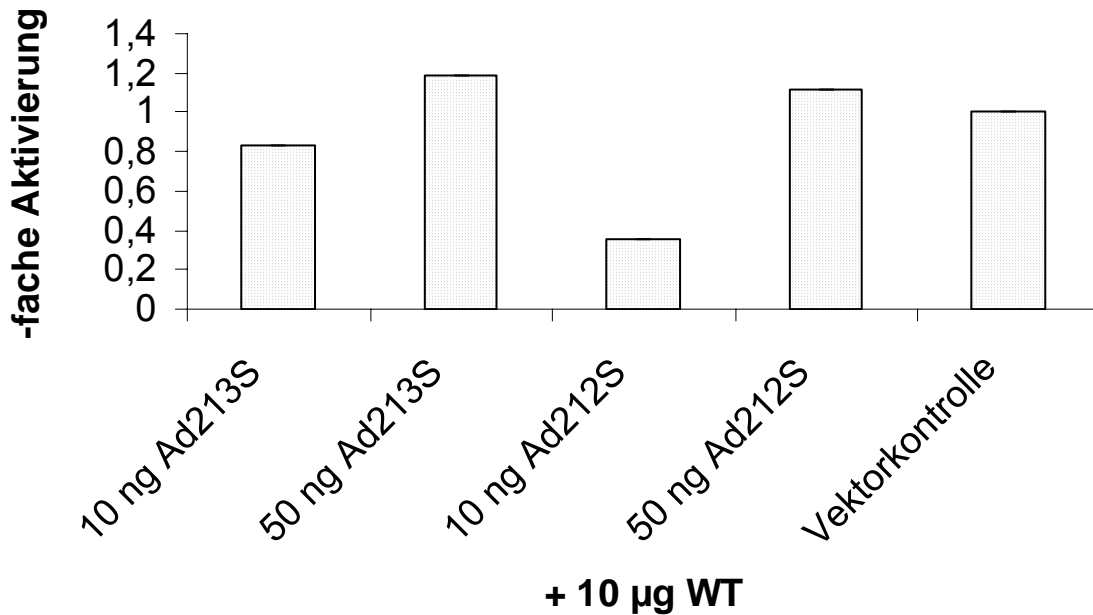
Der *Hsp70*-Promotor wurde 3-fach durch die Spm2-Mutante in der B-Zelllinie BC-3 aktiviert (A). Der hTERT-Promotor konnte von der Spm2-Mutante in den BC-3-Zellen nicht aktiviert werden (B). Im Gegensatz dazu zeigte sich eine ca. 5-fache-Aktivierung des hTERT-Promotors durch Spm2-Mutante in den Melanomzellen (Abb. 23).

Der *Hsp70*-Promotor wurde minimal durch die Spm2-Mutante aktiviert und bei dem hTERT-Promotor konnte, wie auch schon zuvor bei dem LANAp, keine Aktivierung durch die Spm2-Mutante in den HHV-8-positiven Zellen beobachtet werden.

Da keiner der hier verwendeten Promotoren durch E1A in den HHV-8-positiven B-Lymphozyten reguliert werden konnte, stellt sich die Frage, ob E1A in B-Zellen funktionell aktiv ist.

#### **4.7.4 Einfluss der Expression von Ad2 E1A auf die Aktivität des WT LANAp in der HHV-8-negativen B-Zelllinie RPMI8226**

Da weder der hTERT- noch der *Hsp70*-Promotor durch E1A in der HHV-8-positiven B-Zelllinie BC-3 aktiviert werden konnte, stellte sich hier die Frage, ob die mangelnde E1A-Regulation möglicherweise spezifisch ist für B-Zellen. Daher sollte untersucht werden, ob die mangelnde Aktivierung des WT-LANAp's auch in einer HHV-8-negativen B-Zelllinie wiederzufinden ist. Dazu wurde der WT LANAp sowohl mit Ad2 A 13S als auch 12S in die HHV-8-negative B-Zelllinie RPMI8226 kotransfiziert. Nach 48 h wurde die Aktivität des Promotors durch Ad2 E1A mittels Luciferase-Assay ausgewertet.



**Abb. 28: Einfluss von Ad2 E1A auf die Aktivität des WT LANAp in der HHV-8-negativen B-Zelllinie RPMI8226.** Der WT-LANAp wurde mit der Ad2 13S bzw. 12S in RPMI8226-Zellen kotransfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h nach Transfektion gemessen. Die gezeigten Werte sind die eines repräsentativen Experimentes in Einfachbestimmung relativ zu den Vektorkontrollen.

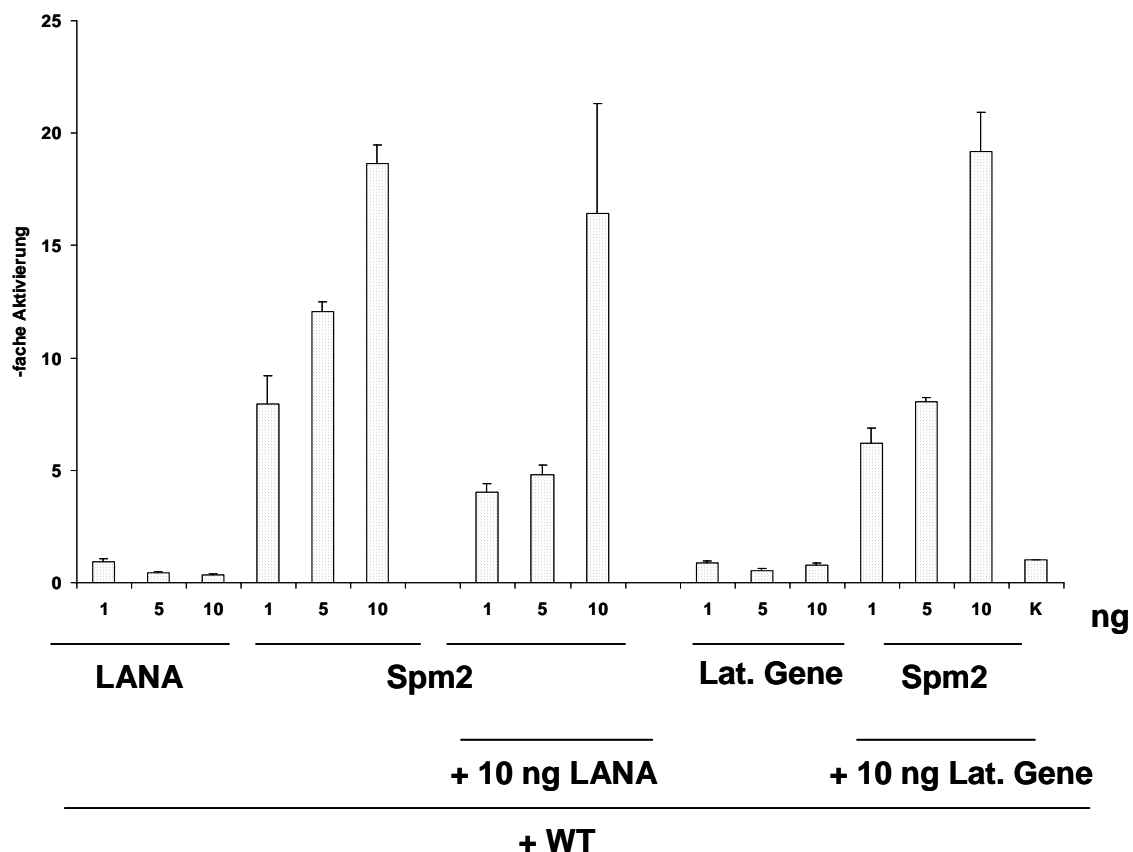
Der WT LANAp konnte in der HHV-8-positiven B-Lymphozytenlinie BC-3 durch Ad2 E1A nicht aktiviert werden (Vergleich: Abb. 25). Auch in der HHV-8-negativen B-Zelllinie RPMI8226 konnte keine Aktivierung durch Ad2 E1A gefunden werden. Bei der Ad2 12S konnte von einer dosisabhängigen Suppression ausgegangen werden, da bei einer DNA-Konzentration von 10 ng die Aktivität des WT LANAp in den RPMI8226-Zellen um ca. 60% supprimiert war. Eine Konzentration von 50 ng hingegen zeigte keinerlei Einfluss auf die Aktivität des WT LANAp.

Also konnte keine Regulation des LANAp durch E1A in B-Lymphozyten nachgewiesen werden.

## **4.8 Einfluss der Expression der latenten Gene von HHV-8 auf die Aktivierung des WT LANAp durch E1A**

### **4.8.1 Einfluss der Expression der latenten Gene von HHV-8 auf die Aktivierung des WT LANAp durch die Ad12 Spm2-Mutante**

Jeong *et al.* (2004) haben beschrieben, dass LANA den LANAp in HEK293-Zellen autoaktiviert. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, ob LANA oder alle drei latenten Gene, LANA, vFLIP und vCyclin (vCYC), gemeinsam den LANAp auch in MV-3-Zellen autoaktivieren können. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob möglicherweise die Regulation des LANAp durch E1A durch eine gleichzeitige Expression von LANA oder den drei latenten Genen gemeinsam verändert wird. Weiterhin sollte so ausgeschlossen werden, dass die Verringerung der Aktivierung des WT LANAp durch die Spm2-Mutante in den HHV-8-positiven Zellen BC-3 auf den Einfluss der Expression der latenten Gene von HHV-8 zurückzuführen ist. Daher wurde der WT LANAp mit der Spm2-Mutante in die Melanomzelllinie MV3 kotransfiziert. Des Weiteren wurde der Promotor mit Spm2-Mutante und LANA kotransfiziert, und es erfolgte die Kotransfektion des Promotors mit der Spm2-Mutante und allen drei latenten Genen, LANA, vFLIP und vCyclin auf einem Expressionsvektor. Nach 48 h erfolgte die Auswertung mittels Luciferase-Assay.



**Abb. 29: Einfluss von LANA alleine und vCyclin, vFLIP und LANA zusammen auf die Aktivierung des WT LANAp durch die Spm2-Mutante in der Melanomzelllinie MV3.** Das WT LANAp-Reportergenkonstrukt wurde mit der Spm2-Mutante in MV3-Zellen kotransfiziert. Weiterhin wurde der pGL3-WT LANAp mit der Spm2-Mutante und LANA kotransfiziert und es erfolgte eine Kotransfektion des Promotors mit Spm2-Mutante und allen drei latenten Genen auf einem Expressionsvektor. Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h nach Transfektion gemessen. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte und die mittlere Standardabweichung eines Experimentes in Dreifachbestimmung relativ zu den Kontrollen.

Die Aktivierung des LANAp durch die Spm2-Mutante wurde nicht durch die Expression von LANA oder durch die Expression aller drei latenten Gene, vCyclin, vFLIP und LANA, in der Melanomzelllinie MV3 beeinträchtigt.

Weder durch die Expression von LANA alleine noch durch die Expression der drei latenten Gene vCyclin, vFLIP und LANA zusammen konnte der Promotor aktiviert werden. Die Aktivierung des Promotors durch die Spm2-Mutante wurde nicht durch die Expression von LANA vermindert, wobei bei geringen DNA-Menge der Spm2-Mutante die Aktivierung des Promotors durch die Spm2-Mutante etwa um die Hälfte vermindert ist. Bei einer Menge von 5 ng betrug die Reduktion sogar etwas mehr als die Hälfte. Hier wurde immer eine gleichbleibende DNA-Menge an LANA (10 ng)

verwendet. Bei gleicher DNA-Konzentration an LANA und Spm2-Mutante fiel die Reduzierung der Aktivierung des WT-LANAp's nur noch minimal aus.

Der Einfluss aller drei latenten Gene zusammen auf die Aktivierung des Promotors durch die Spm2-Mutante fiel nur minimal aus. Bei einer DNA-Menge von 5 ng Spm2-Mutante und 10 ng der latenten Gene war die Aktivierung des Promotors ca. um ein Drittel reduziert. Bei allen anderen Mengen waren keine Auswirkungen auf die Aktivierung des Promotors durch die Spm2-Mutante sichtbar.

In der Melanomzelllinie MV3 konnte durch die Expression von LANA eine minimale Veränderung der Aktivierung des LANAp durch die Spm2-Mutante beobachtet werden. Die Expression der drei latenten Gene vCyclin, vFLIP und LANA zeigten dagegen keine Veränderung der Aktivierung des LANAp durch die Spm2-Mutante. LANA selbst konnte den LANAp nicht regulieren.

#### **4.9 Einfluss von E1A auf das Überleben der HHV-8-positiven BC-3-Zellen**

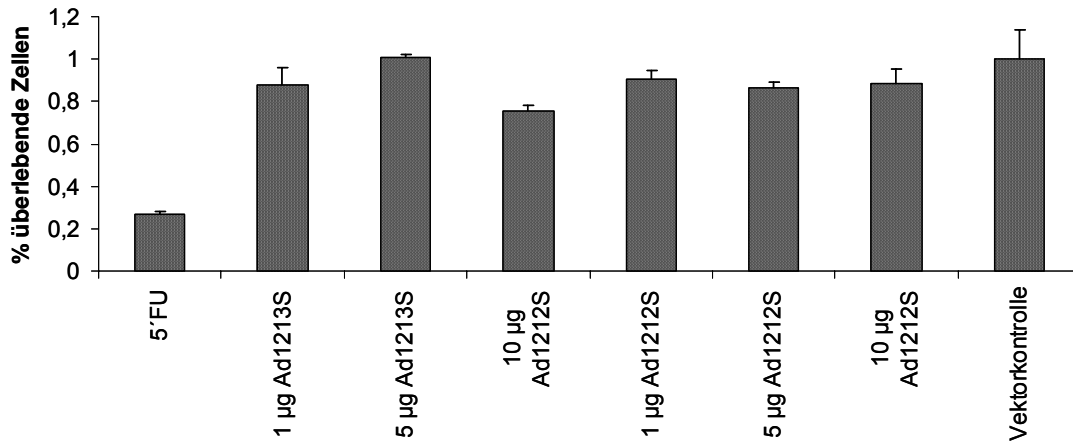
Da E1A-Proteine als Tumorsuppressoren beschrieben wurde, die in Tumorzellen Apoptose induzieren (Sánchez-Prieto *et al.*, 1995; Sánchez-Prieto *et al.*, 1996; Chiou und White, 1997; Samuelson und Lowe, 1997; Deng *et al.*, 1998) sollte hier untersucht werden, ob E1A trotz der Aktivierung des LANAp einen Einfluss auf das Überleben der HHV-8-positiven B-Lymphozytenzelllinie BC-3 hat.

##### **4.9.1 Einfluss von Ad12 E1A und Ad12 Spm2 auf das Überleben der HHV-8-positiven B-Lymphozytenzelllinie BC-3**

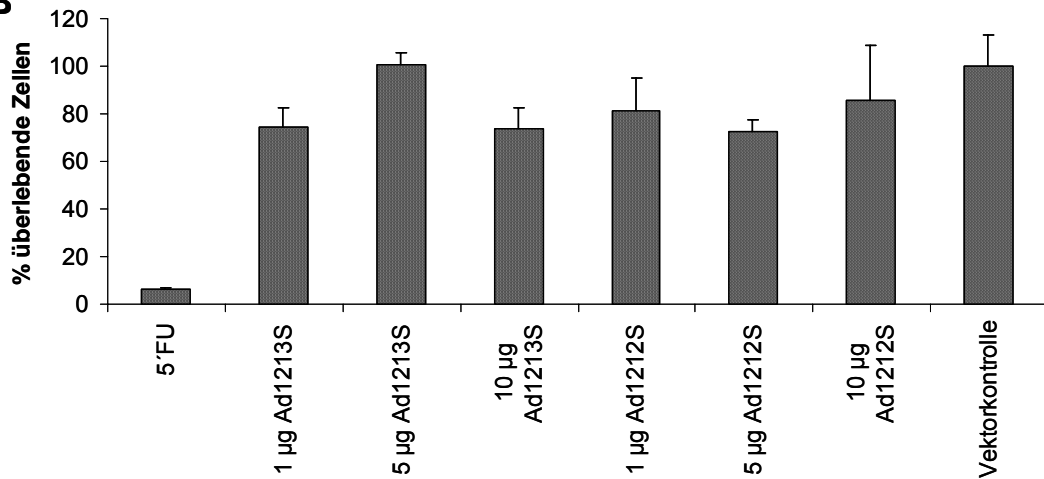
Um Einfluss von Ad12 13S und 12S auf das Überleben der HHV-8-positiven B-Lymphozyten BC-3 zu untersuchen, wurden BC-3-Zellen transient mit Ad12 13S bzw.

12S oder mit der Spm2-Mutante transfiziert. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurde die relative Anzahl der überlebenden Zellen mittels MTT-Test bestimmt.

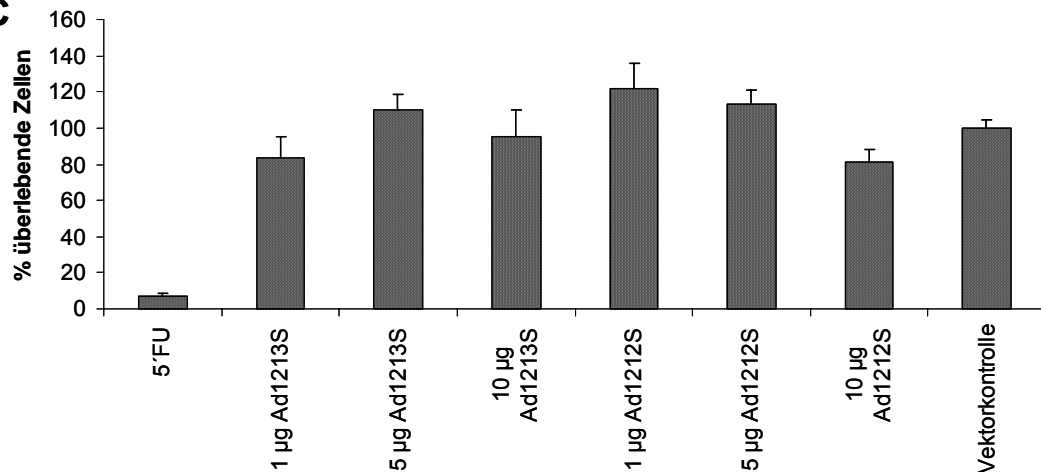
**A**



**B**



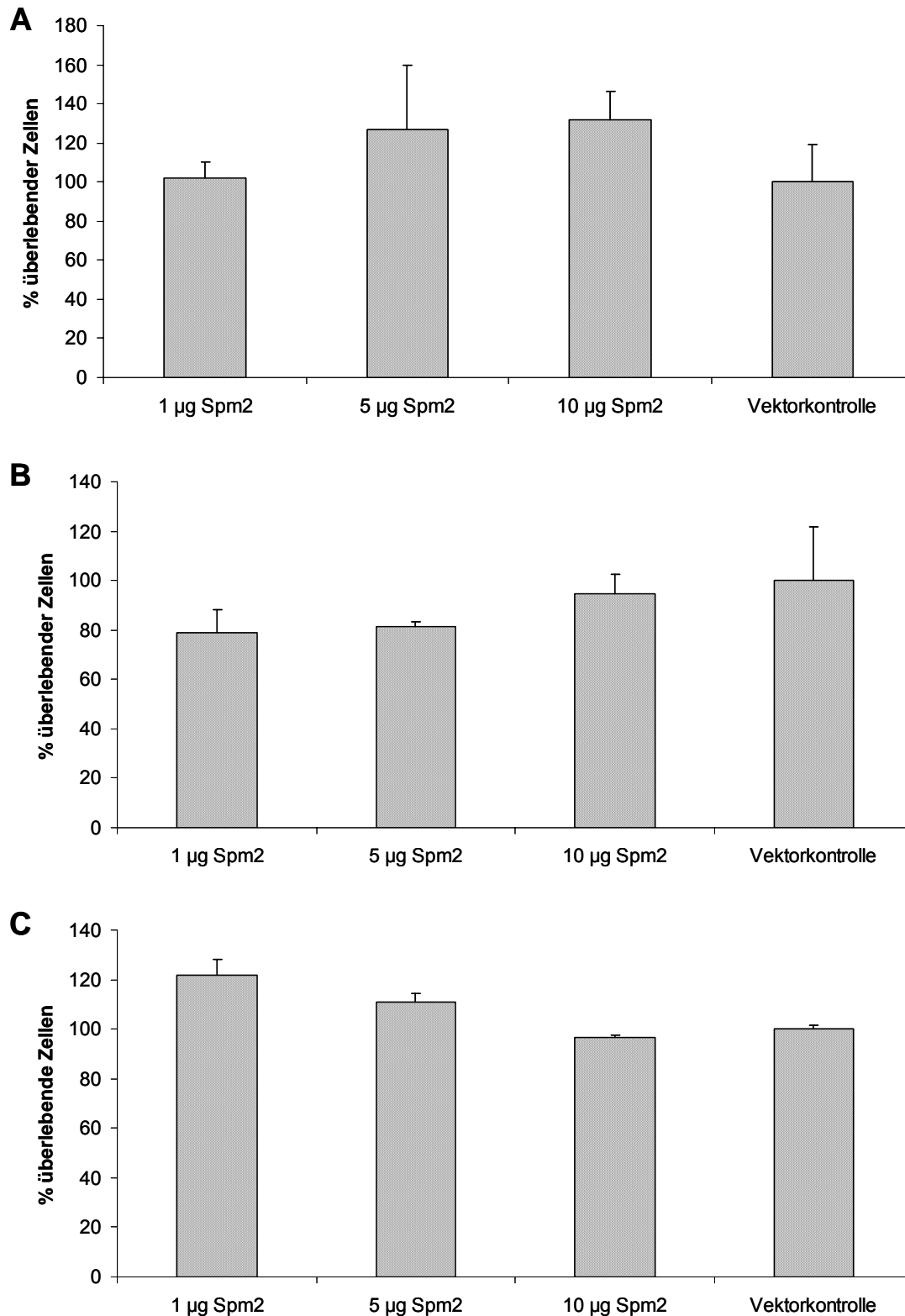
**C**



**Abb. 30: Untersuchung des Überlebens der HHV-8-positiven B-Lymphozyten unter dem Einfluss von Ad12 E1A.** Die Abbildungen zeigen die relative Anzahl der überlebenden Zellen in % nach 24 h (A), 48 h (B) und nach 72 h (C) jeweils im Vergleich zu pRc/RSV-transfizierter Kontrolle. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte und die mittlere Standardabweichung eines repräsentativen Experimentes in Dreifachbestimmung relativ zu den Kontrollen.

Die HHV-8-positiven B-Lymphozytenlinie BC-3 ließ unter dem Einfluss von Ad12 13S und 12S keinerlei Zeichen auf ein Absterben der Zellen erkennen. Als Kontrolle für den Zelltod wurde hier 5'FU verwendet. Es war deutlich zu erkennen, dass die Anzahl der lebenden Zellen von 24 h auf 48 h ca. um ein Drittel abnahm. In den E1A-transfizierten Zellen konnte keine Abnahme der lebenden Zellzahlen verzeichnet werden.

Nachdem Ad12 E1A keinen Einfluss auf das Überleben der HHV-8-positiven B-Lymphozytenlinie BC-3 nehmen konnte, sollte untersucht werden, ob die Spm2-Mutante die Lebendzellzahlen negativ beeinflussen kann. Dazu wurde Spm2-Mutante in die BC-3-Zellen transient transfiziert und nach 24 h, 48 h und 72 h wurde die relative Anzahl der überlebenden Zellen mittels MTT-Assay bestimmt.



**Abb. 31: Einfluss der Spm2-Mutante auf das Überleben der HHV-8-positiven B-Lymphozyten.** Die Abbildungen zeigen die relative Anzahl der überlebenden Zellen in % nach 24 h (A), 48 h (B) und nach 72 h (C) jeweils im Vergleich zu pVP22-transfizierter Kontrolle. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte und die mittlere Standardabweichung eines repräsentativen Experimentes in Dreifachbestimmung relativ zu den Kontrollen.

Genau wie die Ad12 E1A (Abb. 30) konnte die Spm2-Mutante weder nach 24 h, 48 h oder nach 72 h die überlebenden Zellzahlen der HHV-8-positiven B-Lymphozyten negativ beeinflussen.

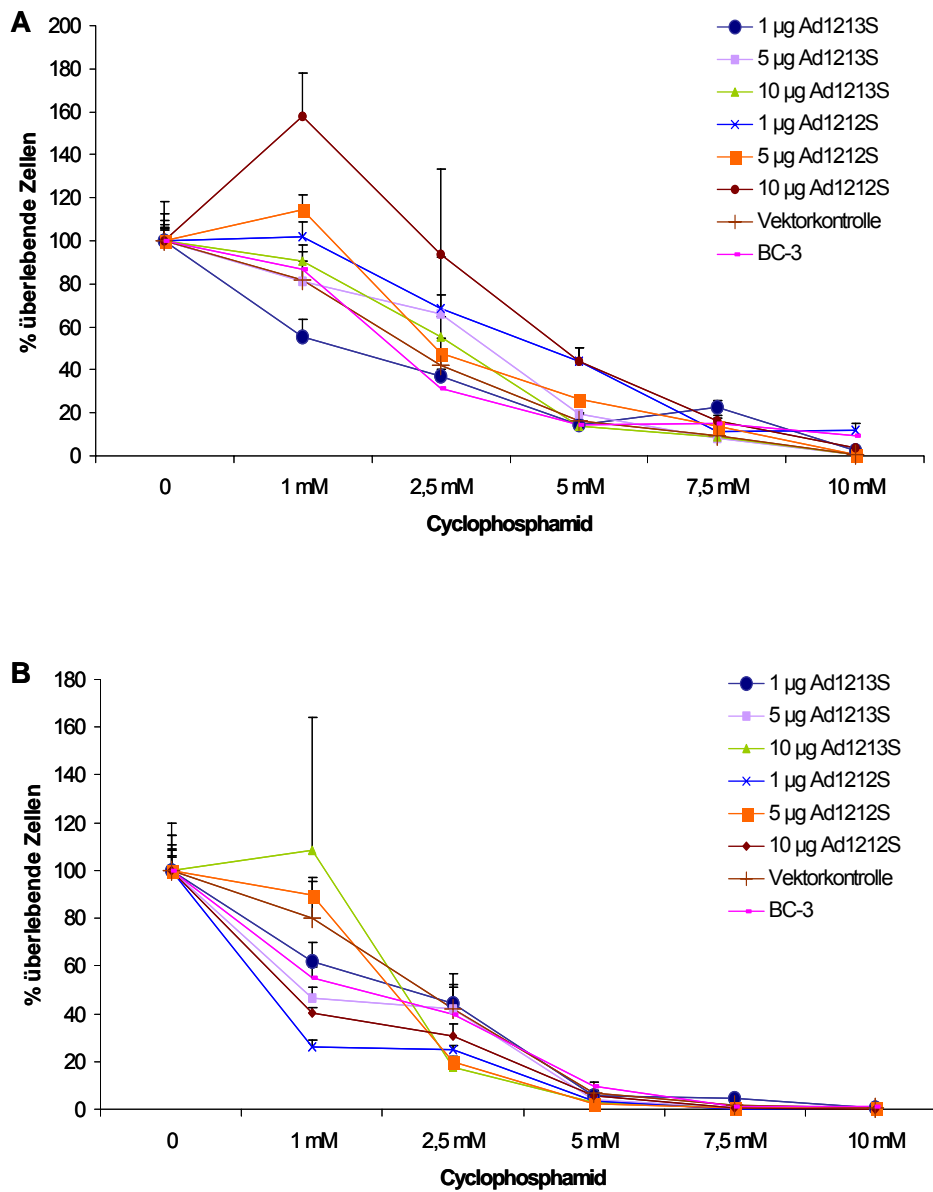
Dadurch konnte kein Einfluss von E1A auf das Überleben der HHV-8-positiven Zellen beobachtet werden.

#### **4.9.2 Überprüfung der Chemosensibilisierung der HHV-8-positiven B-Lymphozyten BC-3 durch Ad12 E1A**

Eine bei der Behandlung maligner Erkrankungen immer wieder auftauchende Problematik ist die Resistenzbildung von Tumoren gegenüber Zytostatika und die damit verbundene im Verlauf einer Tumorthherapie einsetzende Unwirksamkeit dieser Therapeutika. Viele dieser Substanzen bewirken eine Schädigung der DNA in den behandelten Zellen und induzieren dabei Apoptose (Fritsche *et al.*, 1993). Neben der häufig beschriebenen Induktion von p53-abhängiger Apoptose durch Zytostatika werden auch p53-unabhängige Apoptosemechanismen diskutiert (Coleman *et al.*, 2002).

Eine bereits bekannte Funktion der E1A-Proteine ist ihre Fähigkeit, die Zytostatika-Resistenzbildung bei Tumorzellen zu revertieren (Lowe und Ruley, 1993; Frisch und Dolter 1995; Sánchez-Prieto *et al.*, 1995). Es stellte sich daher die Frage, ob auch das im Zuge dieser Arbeit verwendete Ad12 E1A bzw. die Spm2-Mutante in der Lage sind, die HHV-8-positive B-Lymphozytenlinie BC-3 für die Behandlung mit dem in der Klinik häufig bei Lymphomen verwendeten Zytostatikum Cyclophosphamid zu sensibilisieren.

Es sollte untersucht werden, ob die transiente Expression von Ad12 E1A in der Zelllinie BC-3 eine Sensibilisierung gegenüber der Cyclophosphamidbehandlung bewirkt. Dazu wurden die Zellen mit Ad12 13S bzw. 12S transient transfiziert und 24 h inkubiert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen über einen Zeitraum von weiteren 24 Stunden bzw. 48 Stunden mit bis zu 10 mM Cyclophosphamid im Medium behandelt und anschließend wurde mittels eines MTT-Tests die relative Anzahl der überlebenden Zellen bestimmt.



**Abb. 32: Untersuchung der Resistenz der transient mit Ad12 E1A-cDNA transfizierten HHV-8-positiven B-Lymphozytenlinie BC-3 gegenüber der Cyclophosphamidbehandlung.** Die Abbildungen zeigen die relative Anzahl der überlebenden Zellen in % der jeweiligen Zelllinien nach 24 h (A) und 48 h (B) Behandlungsdauer mit verschiedenen Cyclophosphamidkonzentrationen. Ein Vergleich zu untransfizierter oder pRc/RSV-transfizierter Kontrolle ist ebenfalls abgebildet. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte und die mittlere Standardabweichung eines repräsentativen Experimentes in Dreifachbestimmung relativ zu den Kontrollen.

24 h nach Behandlung der HHV-8-positiven B-Lymphozytenlinie BC-3 mit Cyclophosphamid konnte keine Resistenz gegenüber dem Zytostatikum festgestellt werden (A). Die Zellen starben ab einer Konzentration von 1 mM Cyclophosphamid und die Zellzahl nahm mit zunehmender Konzentration an Cyclophosphamid ab.

In den Zellen, die transient mit Ad12 E1A-cDNA transfiziert wurden, konnte 24 h nach Behandlung mit Cyclophosphamid keine höhere Absterberate gegenüber den untransfizierten Zellen verzeichnet werden (A).

48 h nach Behandlung mit Cyclophosphamid war noch immer keine Resistenz der BC-3-Zellen gegenüber dem Zytostatikum zu erkennen (B). Allerdings gab es 48 h nach der Behandlung mit Cyclophosphamid bei einer Konzentration von 5 mM bereits kaum noch überlebende Zellen.

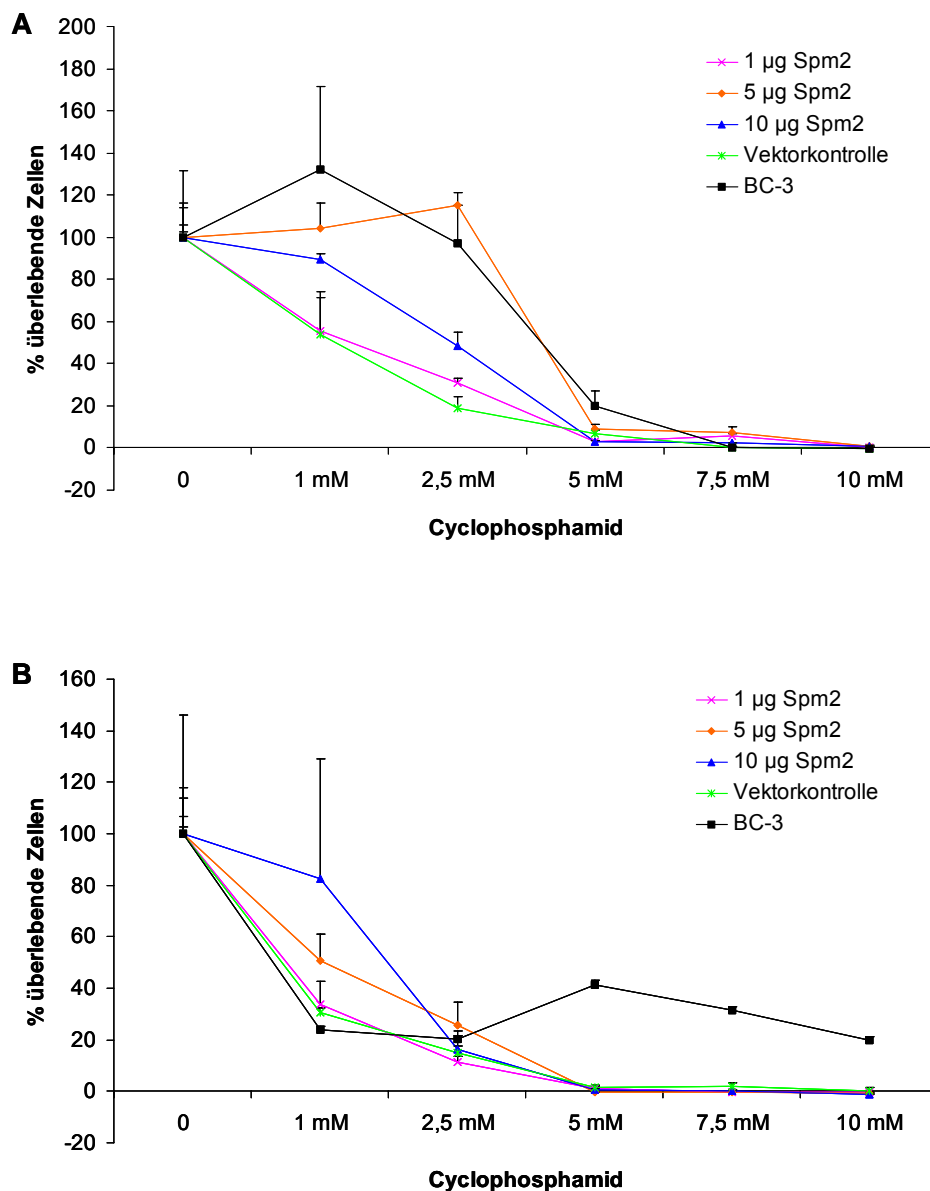
Bei den mit Ad12 E1A-cDNA transfizierten Zellen war eine leichte Sensibilisierung gegenüber Cyclophosphamid zu erkennen (B). Die Zellen, die mit einer Menge von 1 µg Ad12 12S transfiziert wurden, hatten eine um ca. zwei Drittel reduzierte Überlebensrate gegenüber der Vektorkontrolle und eine um ca. die Hälfte reduzierte Überlebensrate gegenüber der untransfizierten Kontrolle bei einer Konzentration von 1 mM Cyclophosphamid. Bei einer Konzentration von 2,5 mM Cyclophosphamid war die Überlebensrate der mit 1 µg Ad12 12S transfizierten Zellen immer noch um die Hälfte geringer als die der untransfizierten Kontrolle bzw. der Vektorkontrolle. Auch die Zellen, die mit 5 µg Ad12 12S transfiziert wurden, ließen eine reduzierte Überlebensrate von ca. 0,5 erkennen. Die Zellen, die mit 10 µg Ad12 13S transfiziert wurden, zeigten bei einer Cyclophosphamid-Konzentration von 2,5 mM eine um die Hälfte verringerte Überlebensrate im Vergleich mit den Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden und mit den untransfizierten Zellen.

Daher war ein Hinweis eine dosisabhängige Chemosensibilisierung der HHV-8-positiven Zellen durch Ad12 E1A zu erkennen.

#### **4.9.3 Überprüfung der Chemosensibilisierung der HHV-8-positiven B-Lymphozyten BC-3 durch die Ad12 Spm2-Mutante**

Nachdem durch Ad12 E1A eine dosisabhängige Sensibilisierung der HHV-8-positiven BC-3-Zellen gegenüber dem Zytostatikum Cyclophosphamid beobachtet werden konnte und da die Spm2-Mutante den Promotor der latenten Gene von HHV-8 in transienten Expressionsstudien am stärksten aktivieren konnte (Abb. 17, Abb. 18 und Abb. 19), sollte überprüft werden, ob die Spm2-Mutante einen Einfluss auf

das Überleben der B-Lymphozytenlinie BC-3 nach Behandlung mit Cyclophosphamid hat. Dazu wurde die Spm2-Mutante transient in die BC-3-Zellen transfiziert und 24 h inkubiert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen über einen Zeitraum von weiteren 24 Stunden bzw. 48 Stunden mit bis zu 10 mM Cyclophosphamid im Medium behandelt. Danach wurde mittels eines MTT-Tests die relative Anzahl der überlebenden Zellen bestimmt.



**Abb. 33: Untersuchung des Überlebens der transient mit der Spm2-Mutante transfizierten HHV-8-positiven B-Lymphozytenlinie BC-3 gegenüber der Cyclophosphamidbehandlung.** Die Abbildungen zeigen die relative Anzahl der überlebenden Zellen in % der jeweiligen Zelllinien nach 24 h (A) und 48 h (B) Behandlungsdauer mit verschiedenen Cyclophosphamidkonzentrationen. Ein Vergleich zu untransfizierter oder pVP22-transfizierter Kontrolle ist ebenfalls abgebildet. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte und die mittlere Standardabweichung eines repräsentativen Experimentes in Dreifachbestimmung relativ zu den Kontrollen.

Weder nach 24 h noch nach 48 h Stunden war eine Änderung des Proliferationsverhaltens der transient mit der Spm2-Mutante transfizierten B-Lymphozytenlinie BC-3 zu erkennen.

Nach 24 h waren bei einer Konzentration von 5 mM Cyclophosphamid kaum noch überlebende Zellen zu finden mit Ausnahme der untransfizierten Zellen, bei der fast alle Zellen erst bei einer Konzentration von 7,5 mM Cyclophosphamid abgestorben waren.

Nach 48 h waren die Zellen aller transfizierten Zelllinien bei einer Konzentration von 5 mM Cyclophosphamid abgestorben.

Weder nach 24 h noch nach 48 h war eine Sensibilisierung der mit der Spm2-Mutante transfizierten HHV-8-positiven B-Lymphozytenlinie BC-3 gegenüber Cyclophosphamid zu verzeichnen, verglichen mit der Vektorkontrolle oder den untransfizierten BC-3-Zellen.

Deshalb konnte durch die Spm2-Mutante keine Veränderung auf das Überleben der HHV-8-positiven B-Lymphozyten BC-3 nach Behandlung mit dem Zytostatikum Cyclophosphamid beobachtet werden.

Zusammenfassend bedeuten die hier gefundenen Ergebnisse, dass der LANAp sowohl in der Melanomzelllinie MV3 als auch in der HHV-8-positiven B-Lymphozytenlinie BC-3 eine ausreichende Basisaktivität aufwies, die keinen Zweifel an der Funktionalität des LANAp-Konstruktes und seiner Deletionsmutanten aufkommen ließ und darum Anlass für weitere Untersuchungen gab.

Weiterhin wurden sowohl der LANAp als auch seine Deletionsmutanten durch E1A aktiviert, insbesondere durch die Spm2-Mutante, die den Promotor und seine Deletionsmutanten in MV-3-Zellen besonders stark aktivieren konnte.

Jedoch konnte kein Einfluss auf das Überleben der HHV-8-positiven Zellen durch E1A beobachtet werden.

Nur nach Behandlung der HHV-8-positiven BC-3-Zellen mit dem Zytostatikum Cyclophosphamid konnte eine dosisabhängige Sensibilisierung durch Ad12 E1A beobachtet werden (4.9.2), nicht aber durch die Spm2-Mutante.

Die Spm2-Mutante ist möglicherweise auf Grund der mangelnden pRb-Bindung nicht in der Lage Zellen zu sensibilisieren.

## 5 Diskussion

Auf der Basis seiner antitumorigenen Funktionen *in vitro* und in Tiermodellen hat E1A bereits seinen Weg in klinische Studien für HER-2/neu-überexprimierende Ovarial- und Mammakarzinome wie auch für Kopf- und Halstumore gefunden (Hortobagyi *et al.*, 2001; Villaret *et al.*, 2002; Madhusudan *et al.*, 2004). Diese Studien zeigten die Sicherheit und die Wirksamkeit einer Gentherapie mit Plasmid-DNA-Komplexen, die E1A-Proteine von einem genomischen DNA-Stück exprimieren. In Patienten mit Kopf- und Halstumoren konnte eine mäßige Tumorreduktion beobachtet werden (Villaret *et al.*, 2002), mit dem Ziel für weitere Evaluierungen in Bezug auf E1A als therapeutischem Transgen.

Die AIDS-assoziierte Form des Kaposi-Sarkom (KS), dessen Entstehung mit der Infektion von HHV-8 assoziiert wird, wurde 1981 entdeckt (Anon, 1981). Nachdem die AIDS-Epidemie sich verbreitete, wurde KS die häufigste Neoplasie in Patienten, die mit HIV-1 infiziert waren. AIDS-KS wurde als wesentlich aggressiver betrachtet und es breitete sich schneller aus als konservativen Formen des KS. Außerdem ist das AIDS-KS schwerer behandelbar als die anderen Formen von KS (Foreman, 2001). Die Prognose ist schlecht, etwa 12 % der AIDS-KS-Patienten sterben durch Komplikationen, die mit dem KS in Verbindung stehen. Die verbleibende Anzahl an Patienten sind durch die Krankheit signifikant beeinträchtigt. Das Vorkommen von KS konnte in den letzten Jahren auf Grund der Einführung der hoch aktiven antiretroviralen Therapie (HAART) zwar stark reduziert werden (Levine und Feigel, 2000), aber in mehr als 50 % der behandelten Patienten schlägt die HAART nicht an. Außerdem tritt KS selbst bei nicht detektierbaren Mengen von HIV wieder auf und die Krankheit verschlechtert sich dann häufig (Deeks *et al.*, 1999; Bower *et al.*, 1999).

E1A-Proteine sind in der Lage zelluläre und virale Gene zu regulieren. Weiterhin wurden die Genprodukte von E1A bereits als potente Tumorsuppressoren identifiziert. In Melanomzellen wurde die Tumorsuppressoraktivität von E1A-Deletionsmutanten überprüft und sie erwiesen sich als transformationsdefekt. Dabei konnte gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist, die transformierenden von den Tumorsuppressor-Eigenschaften zu trennen (Dickopp *et al.*, 2000). Eine transformationsdefekte Mutante von E1A, die von Ad12 abstammt (Rumpf *et al.*,

1999), zeigte *in vivo* Eigenschaften der Tumorreduktion (Kirch *et al.*, persönliche Kommunikation).

Aufgrund dieser Vorkenntnisse konnte davon ausgegangen werden, dass die hier verwendeten E1A-Konstrukte eine im Vergleich zu anderen Methoden, wie der alleinigen Therapie mit Zytokinen und/oder Zytostatika, möglicherweise additive oder synergistische Effekte zeigen und insgesamt die Möglichkeit zu einer schonenderen Behandlung bei HHV-8-positiven malignen Erkrankungen, wie dem KS bieten.

Zudem können E1A-Proteine andere zelluläre und virale Promotoren sowohl positiv, wie bsp. den CMV-Promotor (Metcalf *et al.*, 1994) als auch negativ, wie bsp. den SV40-Promotor (Velcich und Ziff, 1985) oder den HIV-1 LTR (Song *et al.*, 1995; Tsang *et al.*, 1996) regulieren.

Die Expression latenter viraler Gene bei persistierender HHV-8-Infektion ist für die Aufrechterhaltung des episomalen Status des Virus und die Induktion der Immortalisation der Wirtszelle von Bedeutung (Klein, 1994). Ein Produkt des latenten Transkripts 2 (LT2) von HHV-8 kodiert für vCyklin, ein virales Cyklin, das durch die Aktivierung der zellulären Cdk6 die inaktivierende Phosphorylierung von p105-RB induziert, was zur Überwindung der Zellzykluskontrolle (G1-Checkpunkt) beiträgt (Godden-Kent *et al.*, 1997). Das ebenfalls von LT2 translatierte vFLIP scheint antiapoptotische Funktionen zu haben und so zum Überleben der Zellen beizutragen (Bertin *et al.*, 1997). Die Untersuchung des LANAp zeigte, dass ein Minimalpromotor mit 89 bp die Transkription in transienten Transkriptionsversuchen nur unwesentlich schlechter als der Gesamtpromoter aktiviert (Sarid *et al.*, 1999). Der Minimalpromoter enthält neben einer CAAT- und der TATA-Box eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor AP-2.

Die transaktivierende Funktion dieses Transkriptionsfaktors AP2 wurde im Falle des MMP-2-Gens vom Ad5 12S-Protein durch direkte Bindung inhibiert, wobei die p300-bindende Funktion und infolgedessen der N-Terminus von E1A essentiell sind (Somasundaram *et al.*, 1996). Dies legte die Vermutung nahe, dass die E1A-Proteine den LANAp supprimieren könnten, was zur Apoptoseinduktion der Wirtszellen beitragen könnte.

Die hier vorliegende Arbeit diente der Überprüfung des Einflusses von adenoviralem E1A, einem Tumorsuppressor, auf den LANAp. Um den Einfluss von E1A auf den LANAp zu untersuchen wurden drei Deletionsmutanten des Promotors verwendet, die von Sarid *et al.* (1999) bereits beschrieben wurden. Von diesen ausgehend

wurden zwei weitere Deletionsmutanten des LANAp generiert. Eine Sequenzanalyse legte die Vermutung nahe, dass sich Bindungsstellen für regulatorische Elemente, wie Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren der Transkription, auf dem LANAp befinden. Die Deletion einzelner, spezieller Transkriptionsfaktorbindungsstellen sollte weitere Erkenntnisse über die Regulation des LANAp ergeben. Es konnte gezeigt werden, dass E1A den LANAp aktiviert. Auch konnte gezeigt werden, dass der LANAp nur durch E1A-Proteine, die einen intakten Aminoterminus (AA 1-119) tragen, aktiviert werden konnten. Dies wurde in der humanen Melanomzelllinie MV3 gezeigt, die gewählt wurde, weil sie leicht zu transfizieren ist. Es wurde bereits gezeigt, dass die malignen Eigenschaften von Melanomzellen durch transformationsdefekte E1A-Konstrukte zurückgebildet werden können (Dickopp *et al.*, 2000).

Weiterhin sollte untersucht werden, ob es, trotz der Aktivierung des LANAp, einen möglichen Hinweis auf die Induktion von Apoptose durch E1A in den HHV-8-positiven Zellen gibt.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte keine Veränderung des Überlebens der HHV-8-positiven Zellen nach Transfektion mit E1A-cDNA gefunden werden.

Da der programmierte Zelltod auch bei der Sensibilisierung von Tumorzellen durch E1A-Proteine gegenüber zytotoxischen Substanzen eine Rolle spielt (Brader *et al.*, 1997), sollte hier untersucht werden, ob E1A die HHV-8-positiven Zellen gegenüber Zytostatika sensibilisieren kann.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine mögliche Sensibilisierung der HHV-8-positiven Lymphozyten gegenüber dem Zytostatikum Cyclophosphamid durch Ad12 12S beobachtet werden.

## **5.1 Basale Aktivität des LANAp in verschiedenen Zelllinien**

Vor der Überprüfung des Einflusses von E1A auf den LANAp sollte zunächst dessen Funktionalität und Basisaktivität in verschiedenen Zelllinien untersucht werden. Neue Experimente zur Charakterisierung von Promotorelementen des LANAp wurden in verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Dabei wurden nicht nur Zellen verwendet, die B-lymphoiden Ursprungs sind, sondern auch Zellen aus anderen Geweben, wie

HeLa-, Saos-2-, BHK-Zellen und andere Zellen (Sarid *et al.*, 1999; Jeong *et al.*, 2001). Besonders häufig wurden aber auch 293-Zellen verwendet, die Ad5-E1A und E1B-Gene exprimieren (Sarid *et al.*, 1999; Jeong *et al.*, 2001). In allen diesen Zellen zeigte der LANAp Basisaktivität. LANA wurde weiterhin exprimiert, nachdem eine Vielzahl von adhärennten Zellen mit HHV-8-Virionen transduziert wurden (Bechtel *et al.*, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Überprüfung der Basisaktivitäten und der Funktionalität des Promotors in den Melanomzelllinien MV3 und BLM, den Lungenkarzinomzelllinien H460 und H1299, der Zervixkarzinomzelllinie HeLa, in der B-Lymphozytenzelllinie BC-3 (welche HHV-8-positiv ist) und in RPMI8226-Zellen. Ursprünglich sollten diese Untersuchungen auch in KS-Zellen und in mit HHV-8-infizierten Endothelzellen durchgeführt werden. Dies war aber auf Grund mangelnder Transfektionseffizienz nicht möglich.

Melanomzell- linie MV3	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Zunahme der Basisaktivität von LANAp proportional zu der Länge der Region stromaufwärts des Transkriptionsstarts bis Position –67 bp mit der stärksten Basisaktivität für den del-262-Promotor</li> <li>➤ Keine Basisaktivität des del-59SP1-Promotors sichtbar</li> </ul>
Lungenkar- zinomzelllinie H1299	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Basisaktivität des WT LANAp stärker als in MV-3-Zellen</li> <li>➤ Basisaktivität des WT LANAp schwächer als die Basisaktivität des del-262- und del-67-Promotors</li> <li>➤ Stärke der Basisaktivität des del –262-Promotors und del-67-Promotors gleich</li> </ul>
HHV-8-positive B-Lymphozyten BC-3	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Stärkste Basisaktivität des WT LANAp von allen getesteten Zelllinien</li> <li>➤ Basisaktivität des WT LANAp stärker als die Basisaktivität des del-262-Promotors</li> </ul>

**Tab. 3: Vergleichsübersicht der Basisaktivitäten des LANAp und seiner Promotorkonstrukte.** Die unterschiedlichen Basisaktivitäten von LANAp in den unterschiedlichen Zelllinien ist hier gegenübergestellt.

Die Basisaktivität des WT LANAp war in den BLM-, den H460-, und in den HeLa-Zellen schwächer als in den MV-3-Zellen. In den RPMI8226-Zellen konnte keine basale Aktivität des WT LANAp detektiert werden.

Der WT LANAp zeigte in der Melanomzelllinie MV3 eine starke Basisaktivität, wenn diese auch schwächer war als in den B-Lymphozyten BC-3.

Die Zunahme der basalen Promotoraktivität des LANAp proportional zu der Länge der Region stromaufwärts des Transkriptionsstarts ab Position  $-67$  bp mit der höchsten Basisaktivität für den del-262-Promotor in der Melanomzelllinie MV3 lässt vermuten, dass Repressorelemente deletiert wurden. Die Region zwischen  $-263$  bis  $-804$  des Promotors des LANAp trägt einfache oder mehrere Bindungsstellen für SP1, GR, AP-1, Irf1/2, Myc und Jun (Abb. 6; Sarid *et al.*, 1999). Die für die unterschiedlichen Basisaktivitäten des LANAp verantwortlichen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen sind zur Zeit noch Gegenstand der Diskussion. So hat z.B. eine sequenzspezifische Untersuchung auf Transkriptionsfaktoren ergeben, dass sich im Bereich  $-440$  bp bis  $-449$  bp stromabwärts des Transkriptionsstarts ein Repressorelement befindet ([www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/alibaba2/webbaba2.cgi](http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/alibaba2/webbaba2.cgi)). Die Bindungsstelle für dieses Repressorelement, bei dem es sich möglicherweise um CDE („cell cycle-dependent element“) handelt (Zwicker *et al.*, 1995), ist in dem del-262-Promotor nicht mehr vorhanden und könnte insofern die höhere Basisexpression dieses Promotors erklären. Über CDE-vermittelte Mechanismen wird die Transaktivierungsfunktion von SP1 reprimiert (Zwicker *et al.*, 1995).

In den Melanomzellen MV3 lässt die geringere Promotoraktivität des del-59-Promotors, der keine AP-2-Bindungsstellen mehr besitzt, gegenüber dem WT-Promotor darauf schließen, dass die Bindung des Transkriptionsfaktors AP-2 an den LANAp ein wichtiger Faktor für dessen Aktivierung ist.

Dass von dem del-59SP1-Promotor keine basale Aktivität ausging, ließ vermuten, dass die Bindung von SP1 an die zweite SP1-Bindungsstelle, stromabwärts des Transkriptionsstarts notwendig ist für die Aktivierung des LANAp. Die AP-2-Bindungsstelle wurde jedoch bei dem Promotorkonstrukt, das nur noch eine SP1-Bindungsstelle vor dem Transkriptionsstart besitzt, deletiert. Daher kann davon ausgegangen werden, dass zusätzlich zu der von Jeong *et al.* (2004) als essentiell für die Promotoraktivierung beschriebenen ersten SP1-Bindungsstelle stromabwärts des Transkriptionsstarts noch die AP-2-Bindungsstelle als notwendig für die basale Aktivierung des LANAp hinzugefügt werden muss. Obwohl der Transkriptionsfaktor SP1 in allen Säugetierzellen exprimiert wird, wurde bereits gezeigt, dass die Regulation der Transkription durch SP1 über Interaktion mit anderen Ko-Faktoren

verändert werden kann (Xu *et al.*, 2002). Bindungsstellen für andere Transkriptionsfaktoren wie AP-2 werden häufig in der Nähe von SP1-Erkennungssequenzen gefunden (Getman *et al.*, 1995; Tang *et al.*, 1997; Mitchell *et al.*, 1991). Daher kann davon ausgegangen werden, dass diese Faktoren miteinander interagieren, um die Transkription zu steuern. AP-2-Bindungsstellen wurden in fast allen SP1-abhängigen Promotoren gefunden, und die Bindung von AP-2 an den Promotor kann die Transkription verstärken, wenn die AP-2-Bindungsstellen nicht mit den SP1-Bindungsstellen überlappen, wie im Falle des humanen MnSOD (*SOD2*)-Gens (Xu *et al.*, 2002).

In dem LANAp liegen die Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-2 und SP1 nahe beieinander, aber sie überlappen nicht (Sarid *et al.*, 1999). Die Ergebnisse, die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit gefunden wurden, lassen darauf schließen, dass bereits die Region bis Position –59 stromabwärts des Transkriptionsstarts ausreichend für die konstitutive Aktivität des LANAp in Melanomzellen ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in der Melanomzelllinie MV3 bereits Elemente bis Position –67 stromabwärts des Transkriptionsstarts ausreichend sind für eine stabile Expression.

Die höhere Basisaktivität des del–262-Promotors gegenüber der Basisaktivität des WT LANAp in der Lungenkarzinomzelllinie H1299 lässt vermuten, dass möglicherweise wieder die deletierte Bindungsstelle des o.a. Repressorelements für eine höhere basale Aktivität verantwortlich ist.

In den HHV-8-positiven B-Zellen ist die Promotoraktivierung des del–262-Promotors dagegen erniedrigt gegenüber dem WT-Promotor und deutet darauf hin, dass Elemente deletiert wurden, die für die Aktivierung des Promotors in lymphoiden Zellen notwendig sind. In den B-Zellen ist die Promotoraktivität proportional zur Länge der Sequenz, die stromaufwärts des Transkriptionsstarts liegt, was auf B-Zellspezifische Enhancerelemente hindeuten könnte, die distal der Position –279 liegen (Jeong *et al.*, 2001). Die stark erhöhte Basisaktivität des WT-Promotors in den HHV-8-positiven B-Lymphozyten verglichen mit der Promotoraktivierung in den MV3-Zellen lässt ebenfalls auf eine lymphozytenspezifische Transkriptionsregulation schließen (Sarid *et al.*, 1999). Hier hat die sequenzspezifische Suche nach Transkriptionsfaktoren die Bindungsstelle für LyF-1 im Bereich -362 bp bis -371 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts ([www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/alibaba2/webbaba2.cgi](http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/alibaba2/webbaba2.cgi)) identifiziert. LyF-1 bindet und aktiviert

Enhancer des CD3- $\Delta$ -Gens. Weiterhin ist LyF-1 für die Spezifizierung und Reifung von T-Lymphozyten verantwortlich (Hahm *et al.*, 1994). LyF-1 interagiert mit wichtigen Kontrollelementen des terminalen Deoxynucleotidyltransferase (TDT)-Promotors und auch anderer Promotoren für Gene, die im frühen Stadium der B- und T-Zellentwicklung exprimiert werden (Georgopoulos *et al.*, 1992, Nietfeld und Meyerhans, 1996, Payne *et al.*, 2001). Deshalb könnte die Deletion der Bindungsstelle von LyF-1 der Grund für die niedrigere Expression des del-262-Promotors verglichen mit dem WT-Promotor sein, die nur in den HHV-8-positiven B-Lymphozyten bestätigt werden konnte.

Wie oben bereits erwähnt haben sich auch andere Gruppen mit der Regulation des LANAp beschäftigt (Sarid *et al.*, 1999; Jeong *et al.*, 2001; 2004).

Allerdings ist anzumerken, dass die Promotorkonstrukte von Sarid *et al.* (1999) und von Jeong *et al.* (2004) nicht ganz identisch sind: die Konstrukte von Jeong *et al.* (2004) reichen bis Position +271 stromaufwärts des Transkriptionsstarts, die von Sarid *et al.* (1999) nur bis Position +30 stromaufwärts des Transkriptionsstarts. Die Promotorregion in den von Sarid *et al.* (1999) beschriebenen Konstrukten wurde in die multiple Klonierungsstelle des pGL3-Basis-Vektors inkloniert, wohingegen die Promotorregion in den von Jeong *et al.* (2001; 2004) verwendeten Konstrukten direkt am Luciferase-Startkodon beginnen und folglich die 5' UTR und die Translations-Initiationsequenz des Vektors pGL3-Basic durch KSHV-Sequenzen ersetzt (Jeong *et al.*, 2004). Hier sei anzumerken, dass Jeong *et al.* (2001) verglichen mit Sarid *et al.* (1999) den Transkriptionsstart um ca. 27 bp weiter in Richtung 3'-Ende bestimmt haben. Da die hier verwendeten Konstrukte von den von Sarid *et al.* (1999) erstellten Promotorkonstrukten abgeleitet wurden, befindet sich die Promotorregion in der multiplen Klonierungsstelle des pGL3-Basis-Vektors (Promega) und sie reichen bis Position +30.

Die Ergebnisse der transienten Transfektionsstudien mit den Deletionskonstrukten von Sarid *et al.* (1999) und mit den im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Promotorkonstrukte verglichen mit den Ergebnissen, die Jeong *et al.* (2001;2004) beschrieben hat, zeigen, dass wichtige regulatorische Elemente auf dem LANAp stromabwärts des Transkriptionsstarts angesiedelt sind.

Jeong *et al.* haben ihre Experimente zwar mit einem längeren WT-Promotor und in anderen Zelllinien durchgeführt, trotzdem ist die Tendenz der Promotoraktivität in

etwa konsistent mit den hier gezeigten Ergebnissen in den nichtlymphoiden Zellen, mit Ausnahme der MV3-Zellen in Bezug auf den del -67-Promotor.

Im Gegensatz zu den hier gefundenen Resultaten konnte Sarid *et al.*, 1999 kaum eine Veränderung der basalen Aktivität der drei Promotorkonstrukte verzeichnen, weder in den HeLa- noch in den BJAB-Zellen.

Ein Vergleich der Promotoraktivitäten in verschiedenen Zelllinien zeigte im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Aktivierungspotentiale der Promotorkonstrukte, wie dies auch schon von Jeong *et al.*, beschrieben wurde. Auch die hier gefundenen Ergebnisse in den HHV-8-positiven B-Lymphozyten BC-3 gehen mit den von Jeong *et al.*, 2001 berichteten Ergebnissen in den BCBL-1-Zellen einher.

Sarid *et al.* (1999) beschreiben eine stärkere Promotoraktivierung in den Lymphozyten als in den HeLa-Zellen. Jeong *et al.* (2001) hingegen berichten eine wesentlich stärker Aktivierung des Promotors in den HeLa-Zellen als in HHV-8-positiven Zellen. Die Ergebnisse von Sarid *et al.* (1999) sind konsistent mit den hier gefundenen Resultaten, obwohl für die hier beschriebenen Experimente Melanomzellen verwendet wurden, die eine höhere Promotoraktivität ergaben als die HeLa-Zellen. HeLa-Zellen sind nicht permissiv für eine HHV-8-Infektion (Renne *et al.*, 1998). Die hier gefundenen Ergebnisse stehen allerdings im Gegensatz zu den Beobachtungen von Sarid *et al.* (1999), in denen eine niedrigere Aktivierung des WT-Promotors verglichen mit dem del -262-Promotor in den HHV-8-positiven Lymphozyten beobachtet wurde.

Allerdings wurden die Experimente von Sarid *et al.* (1999) in BJAB-Zellen, die nicht HHV-8-positiv sind, durchgeführt, und dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden in HHV-8-positiven BC-3-Zellen gefunden. Jeong *et al.* (2001) berichten, einhergehend mit den Ergebnissen dieser Arbeit, von einer hohen Aktivierung des WT-Promotors und einer niedrigeren Promotoraktivität des del -262-Promotors sowohl in BJAB- als auch in BC-3-Zellen. Jeong *et al.* (2001) beschreiben Elemente bis Position -273 stromaufwärts des Transkriptionsstarts als erforderlich für eine stabile Expression.

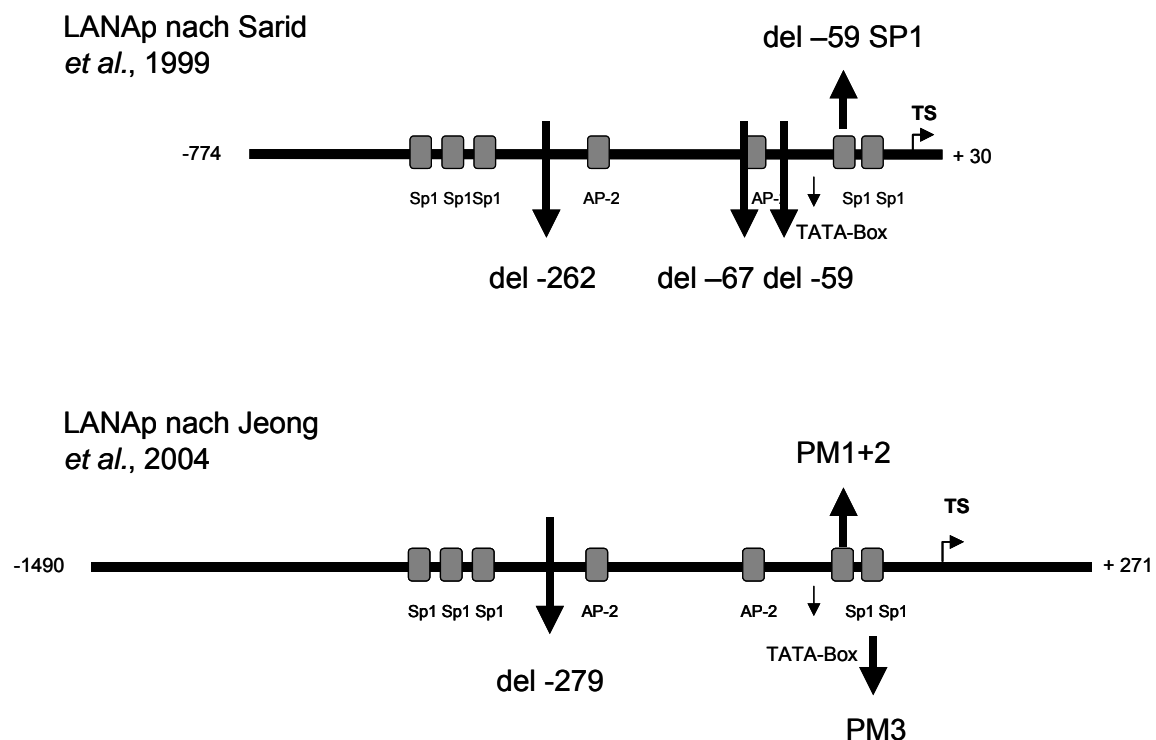
Allerdings unterscheiden sich die hier verwendeten Promotorkonstrukte von denen die Jeong *et al.* (2004) verwendet hatte, in noch einem weiteren Punkt. Die Promotorkonstrukte von Jeong *et al.* (2004), die Deletionen in einer der beiden SP1-Bindungsstellen nach dem Transkriptionsstart tragen, besitzen zusätzlich noch eine AP-2-Bindungsstelle.

Jeong *et al.* (2004) beschreibt eine ca. 50 %-ige Reduktion der Promotoraktivität nach eingefügten Mutationen in der zweiten SP1-Bindungstelle stromabwärts des Transkriptionsstarts. Erst die Mutation der ersten SP1-Bindungsstelle zeigt keine basale Aktivierung des Promotors mehr, so dass diese als essentiell für die Aktivierung des Promotors gilt.

Jeong *et al.* (2001) beschreiben eine minimale Promotorregion bei Position –88 stromaufwärts des Transkriptionsstart, die erforderlich und genügend für die konstitutive Aktivität des LANAp in 293-, (10)1-, BJAB- und SLK-Zellen ist.

Weiterhin konnten Jeong *et al.* (2001) keine Gewebe-spezifischen Unterschiede in der basalen Aktivierung des Promotors entdecken.

Zur Kontrolle der Promotoraktivität diente der humane Promotor des „Heat Shock Proteins“ *Hsp70*. Die Basisaktivität dieses Promotors ist in der Melanomzelllinie MV3 stärker als der LANAp und in den BC-3-Zellen ist der *Hsp70*-Promotor schwächer als der LANAp. Also wurden auch bei dem *Hsp70*-Promotor zelltypspezifische Unterschiede sichtbar.



**Abb. 34: Darstellung der Unterschiede der LANAp's nach Sarid *et al.*, 1999 und nach Jeong *et al.*, 2004.** Der LANAp ist mit den wichtigsten Transkriptionsfaktorbindestellen für AP-2 und SP1 gezeigt. Diese sind nicht maßstabsgetreu dargestellt. Die Promotorkonstrukte del –59 und der del –59 SP1 wurden im Rahmen dieser Arbeit angefertigt. Jeong *et al.* (2004) haben zwei Punktmutationen (PM) von jeweils 2 bp in die zweite SP-1-Bindungstelle stromabwärts des Transkriptionsstarts in unterschiedlichen Konstrukten eingefügt. In einem weiteren Promotorkonstrukt wurde in die erste SP-1-Bindungsstelle stromabwärts des Transkriptionsstarts eine Punktmutation von 2 bp eingefügt.

## 5.2 Aktivität des LANAp unter dem Einfluss der Expression von Ad5 E1A-Proteinen

Das E1A-Gen kodiert aufgrund alternativer Spleißvorgänge, je nach Adenovirus-Subtyp, für fünf bis sechs Proteine. HEK293-Zellen sind mit Ad5 E1A und E1B transformiert, was bedeutet, dass alle fünf E1A-Proteine des Subtyps Ad5 in diesen Zellen exprimiert werden. Gesichert werden aber die beiden großen E1A-Proteine exprimiert, die sowohl für die Transformationsfähigkeit als auch für die Fähigkeit, Apoptose zu induzieren, ausreichend sind.

Außerdem nimmt man an, dass HEK293-Zellen semipermissiv für die HHV-8-Infektion sind (Foreman *et al.*, 1997; Renne *et al.*, 1998).

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte zunächst der Einfluss der Expression von Ad5 E1A-Proteinen auf die Aktivität des WT LANAp untersucht werden.

Ein direkter Vergleich der Aktivierung des LANAp in den HEK293-Zellen mit der Basisaktivität des LANAp in den hier untersuchten Zelllinien zeigte eine deutliche Aktivierung des LANAp durch E1A in den 293-Zellen.

Da im Rahmen dieser Arbeit in den HEK293-Zellen eine sehr starke und signifikante Promotoraktivität des del-262-Promotors und eine wesentlich schwächere Aktivität des WT LANAp beobachtet wurde, ist davon auszugehen, dass in dem Bereich ab Position -262 stromabwärts des Transkriptionsstarts eine Bindungsstelle für ein Repressorelement liegt, das durch E1A-Proteine reguliert wird und dadurch in dem del-262-Promotor nicht mehr vorhanden ist. Auch die abgeschwächte Promotoraktivierung des del-67-Promotor, die aber gegenüber dem WT LANAp immer noch leicht erhöht war, lässt darauf schließen, dass bei dem del-67-Promotor Aktivatorelemente, die von E1A-Proteinen moduliert werden und zwischen den Positionen -262 und -67 sitzen, deletiert wurden. In diesem Bereich liegt laut Sequenzanalyse eine Bindungsstelle für YY1 ([www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/alibaba2/webbaba2.cgi](http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/alibaba2/webbaba2.cgi)). Die Deletion der YY1-Bindungsstelle führt möglicherweise zu einer niedrigeren Aktivierung des del-67-Promotors. YY1 ist ein multifunktionaler Transkriptionsfaktor, der in der Lage ist, eine Reihe von zellulären und viralen Genen sowohl negativ als auch positiv zu regulieren. Die Regulation dieser Gene geschieht durch Bindung von YY1 an Stellen, die den Transkriptionsstart überlappen. Die Funktion von YY1 als Aktivator oder Repressor

hängt von der Anwesenheit weiterer Proteine ab. Bei einer Abwesenheit von E1A fungiert YY1 beispielsweise als Transkriptionsrepressor, in der Gegenwart von E1A-Proteinen jedoch wird die Repressionsfunktion aufgehoben (Zhou und Engel, 1995). Die Aktivierung des del-59-Promotors durch, bei dem die letzte AP-2-Bindungsstelle deletiert wurde, zeigte, dass der LANAp durch E1A-Proteine auch über die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor AP-2 aktiviert wird. Diese Reduktion der Promotoraktivität konnte bereits in Zelllinien ohne E1A-Expression nachgewiesen werden (MV3). Daher ist anzunehmen, dass die AP-2-Bindungsstelle eine wichtige Bindungsstelle sowohl für die Basisaktivität des LANAp als auch für dessen Aktivierung durch E1A-Proteine ist. Diese Ergebnisse bestätigen Jeong *et al.* (2001) in HEK293-Zellen. Allerdings zeigte der im Rahmen dieser Arbeit verwendete del-59-Promotor eine höhere Aktivierung durch E1A-Proteine als das mit Jeong *et al.* (2001) vergleichbare Promotorkonstrukt. Dies liegt aber wahrscheinlich daran, dass der -57-Promotor von Jeong *et al.* (2001) keine komplette TATA-Box mehr besitzt. Deshalb ist davon auszugehen, dass der LANAp auch über die TATA-Box durch E1A-Proteine reguliert wird.

### **5.3 Aktivierung des LANAp durch verschiedene Ad2-, Ad5- und Ad12-E1A-Derivate**

Die Promotoraktivität des LANAp in den HEK293-Zellen zeigte deutliche Unterschiede zu der Aktivität des LANAp in MV3- bzw. H1299-Zellen, die in diesen Zellen wesentlich geringer war. Darum konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass E1A den LANAp reguliert.

Auf Grund der Aktivierung des LANAp durch E1A-Proteine in den HEK293-Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss unterschiedlicher E1A-Konstrukte auf die verschiedenen Konstrukte des LANAp untersucht. Hierbei sollte die Aktivierung des LANAp durch E1A weiter charakterisiert werden, sowohl auf der Promotor- als auch auf E1A-Ebene. In Bezug auf E1A sollten die Domänen untersucht werden, die an der Regulation des LANAp durch E1A beteiligt sind.

E1A-Konstrukt	LANAp-Konstrukte				
	WT LANAp	del-262	del-67	del-59	del-59SP1
Ad2 13S	++	++	+	+	-
Ad2 12S	+	+	+	+	-
Ad5 13S	+++				
Ad5 delCR2	++++				
Ad5	-				
CR3EX2,	-				
Ad5 EX2,	-				
Ad12 Spex	-				
Ad12 13S	-	-	-	+	-
Ad12 12S	+	-	-	+	-
Ad12 Spm2	+++	++	+	+++	++

**Tab. 4: Übersicht über die Aktivierung der verschiedenen Konstrukte von LANAp durch unterschiedliche E1A-Konstrukt in MV-3-Zellen.** Angegeben ist entweder keine Aktivierung (-), schwache Aktivierung (+), Aktivierung (++) und starke Aktivierung (+++). Die stärkste Aktivierung wurde mit ++++ gekennzeichnet. Keine Angabe bedeutet, dass diese Kotransfektion nicht durchgeführt wurde.

Keines der Produkte der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten E1A-Konstrukte war in der Lage, den LANAp oder eines seiner Deletionskonstrukte zu supprimieren.

Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass ausschliesslich E1A-Proteine, die einen intakten Aminoterminus (AS1-119) tragen, in der Lage sind, den LANAp und seine Deletionskonstrukte zu aktivieren. Der Aminoterminus von E1A interagiert mit einigen für die Transkriptionskontrolle wichtigen Transkriptions- und Ko-Faktoren, wie AP-1 und -2, CBP/p300, P/CAF, pRb sowie einigen Pocketproteinen. Im Falle des Ad12 E2-Promotors konnte gezeigt werden, dass eine aminoterminale Punktmutante, die nicht mehr in der Lage war, p300/CBP zu binden, diesen Promotor nicht mehr aktivieren konnte (Fax et al, 2000), so dass die Funktion der Bindung von E1A-Proteinen an p300/CBP auch für die Aktivierung anderer Promotoren angenommen werden kann. Aber auch Myogenin interagiert mit dem N-Terminus, speziell der CR1. Interessanterweise befinden sich zwei Bindungsstellen für MyoD auf dem LANAp ([www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/alibaba2/webbaba2.cgi](http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/alibaba2/webbaba2.cgi)). MyoD steht mit der Muskelzellendifferenzierung in Verbindung

und induziert infolgedessen Fibroblasten zur Differenzierung in Myoblasten. Weiterhin aktiviert dieser Faktor muskelspezifische Promotoren (Braun *et al.*, 1989, Weintraub *et al.*, 1991). Auch der oben bereits beschriebene Transkriptionsfaktor YY1 bindet an den N-Terminus von E1A und aktiviert insofern verschiedene Promotoren (Furlong *et al.*, 1996).

Experimente an anderen Promotoren deuten an, dass E1A-Proteine die Transkription aktivieren, indem sie die Konformation von c-Jun verändern. Es folgt die Phosphorylierung der Transaktivierungsdomäne von c-Jun, die dadurch aktiviert wird. (Sano *et al.*, 1998). Für diese Funktion werden sowohl die CR3 als auch der N-Terminus und die CR1 benötigt. Es ist davon auszugehen, dass die p300-Bindungsfunktion an dieser Transaktivierungsfähigkeit durch E1A-Proteine beteiligt ist (Duyndam *et al.*, 1999), da p300 ebenfalls an den N-Terminus von E1A bindet (Kraus *et al.*, 1992). Möglicherweise bildet p300 einen Komplex mit dem TATAA-abhängigen TATA-bindenden Protein (TBP), und die Funktion von TBP wird so blockiert. Die Dissoziation dieses Komplex durch den N-Terminus von E1A würde dann zu einer Aktivierung des Promotors führen (Kraus *et al.*, 1992). Damit wäre die fehlende Aktivierung durch die CR3EX2- und die EX2-Mutante sowie die SPEX-Mutante zu erklären (Abb. 15).

Als ein weiterer möglicher Aktivator des Promotors über die Interaktion mit dem N-Terminus von E1A wurde Dr beschrieben (Kraus *et al.*, 1992). Dr bindet ebenfalls an den N-Terminus von E1A (Kraus *et al.*, 1994) und inhibiert TBP (Inostroza *et al.*, 1992). Es wird davon ausgegangen, dass das E1A-Protein, abhängig von N-terminalen Sequenzen, den TBP-Dr-Komplex dissoziiert und damit den Transkriptionsfaktor TBP freisetzt (Kraus *et al.*, 1992). Es ist darum anzunehmen, dass der LANAp unter anderem sowohl von den Ko-Faktoren AP-2, MyoD und YY1 als auch über CBP/p300 durch E1A-Proteine aktiviert wird.

Andererseits sind Sequenzen von Position 4 bis 25 innerhalb des N-Terminus von E1A auch für die negative Regulation von Promotoren verantwortlich, bsp. das HIV-1-LTR wahrscheinlich durch Bindung an p300/CBP (Song *et al.*, 1995).

Da der Transkriptionsfaktor SP1 mit der CR3 von E1A interagiert (Liu und Green, 1994), kann davon ausgegangen werden, dass dieser Faktor nicht maßgeblich an der Aktivierung des LANAp durch beteiligt ist. Dagegen scheint der Transkriptionsfaktor SP1 aber einen Einfluss auf die Basisaktivierung des LANAp zu haben (s.o.).

Im Falle des LANAp zeigte sich kaum ein Unterschied in Bezug auf die Aktivierung des del-67-Promotors im Vergleich zu der Aktivierung des del-59-Promotors durch Ad12 13S und Ad12 12S sowie Ad2 E1A.

Eine besondere Bedeutung kommt dabei der Spm2-Mutante zu (Kirch *et al.*, 2002), die nicht mehr in der Lage ist, an Rb zu binden, ebenso wie die Ad5 delCR2. In der „Spacerregion“ der Spm2-Mutante wurden sechs konsekutive Alaninreste deletiert (Rumpf *et al.*, 1999). Es gibt Hinweise darauf, dass diese Mutante tumorsupprimierende Aktivität hat und nicht in der Lage ist Zellen zu transformieren (Kirch *et al.*, unpublizierte Daten). Diese Mutante ist nicht mehr in der Lage, Zellen in Gegenwart von E1B zu transformieren. Weiterhin gibt es Hinweise, dass sie Tumorsuppressoraktivität *in vivo* zeigt (Kirch *et al.*, unpublizierte Daten). Die Spm2-Mutante war einerseits in der Lage, den Einfluss des Repressorelementes zwischen Position –236 und –804 in MV3-Zellen auszugleichen und andererseits stellte sich die fehlende SP1-Bindungsstelle in dem del–59SP1-Promotor als nicht essentiell für die Aktivierung heraus.

Es muss jedoch für Vergleiche bedacht werden, dass das hier verwendete Spm2-Konstrukt eine VP22-Domäne enthält, die für die Steigerung der Transduktionseffizienz im Gewebe verantwortlich ist (Zender *et al.*, 2002) und folglich sowohl die Proteindosis innerhalb der Zellen als auch die Anzahl der transduzierten Zellen erhöht. Allerdings konnte auch mit einem pRc/RSV-Ad12-Spm2-Konstrukt eine stärkere Aktivierung des hTERT-Promotors beobachtet werden als mit WT E1A (Neumann, 2004). Im Gegensatz dazu konnte eine erhöhte Aktivierung des del -59-Promotors durch die Spm2-Mutante gegenüber der Aktivierung der übrigen Promotorkonstrukte durch E1A beobachtet werden, was dafür spricht, dass der Promotor durch die Interaktion von E1A mit dem Transkriptionsfaktor AP-2 supprimiert wird.

Im Gegensatz zu der starken Aktivierung des LANAp durch sowohl die Spm2-Mutante als auch Ad2 E1A in der Melanomzelllinie MV3, konnten diese Ergebnisse in der HHV-8-positiven Zelllinie BC-3 nicht bestätigt werden.

Daher sollte überprüft werden ob die Anwesenheit des endogenen des LANAp die E1A-Proteine über die, an den Promotor, gebundenen Transkriptionsfaktoren bindet, so dass diese den transfizierten LANAp nicht regulieren können. Dazu wurden weitere Ko-Transfektionsexperimente mit zwei verschiedenen Promotoren in der Melanomzelllinie MV3 unternommen. Es handelte sich hierbei um den humanen

Telomerase-Promotor, der von E1A-Proteinen ebenfalls aktiviert wird (Kirch *et al.*, 2000) und den SV-40-Promotor, der durch E1A-Protein reprimiert wird (Velcich und Ziff, 1985). In Bezug auf den humanen TERT-Promotor wurde im Rahmen dieser Arbeit (verglichen mit dem LANAp) nur eine niedrige Aktivierung durch E1A verzeichnet.

Um aber die Funktionalität der hier verwendeten E1A-Konstrukte an einem zweiten Promotor zu bestätigen, wurden diese mit dem SV40-Promotor kotransfiziert. Wie o.a. wird der SV40-Promotor durch E1A-Proteine reprimiert (Velcich und Ziff, 1985). In der hier vorliegenden Arbeit konnte mit allen WT E1A-Konstrukten die Repression des SV40-Promotors beobachtet werden, so dass von einer intakten Funktionalität der Derivate ausgegangen werden kann. Die Aktivierung des Promotors durch die Spm2-Mutante wies keine Veränderung auf. Da aber keine Daten in Bezug auf den Einfluss von Spm2-Mutante auf den SV40-Promotor vorliegen und diese E1A-Mutante sich in Bezug auf den LANAp als potenter Transaktivator gezeigt hat, kann hier durchaus davon ausgegangen werden, dass die Spm2-Mutante funktionell intakt ist.

Von einer prinzipiell mangelnden Funktionalität der E1A-Proteine in B-Lymphozyten kann nicht ausgegangen werden, da Adenoviren menschliche B-Lymphozyten infizieren (Horvath *et al.*, 1991). Trotzdem sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob die Funktionalität der E1A-Proteine in B-Lymphozyten möglicherweise beeinträchtigt ist. Daher wurden weitere Ko-Transfektionsexperimente in RPMI8226-Zellen vorgenommen. Auch in den RPMI8226-Zellen konnte kein Einfluss auf die Aktivierung des LANAp durch E1A beobachtet werden.

Es wurde bereits von anderen Gruppen beschrieben, dass der Aminoterminus erforderlich ist für die Aktivierung von Promotoren durch E1A-Proteine (Song *et al.*, 1995; Duyndam *et al.*, 1996; Sollerbrandt, *et al.*, 1996), wie für den humanen TERT-Promotor (Kirch *et al.*, 2002), den *Hsp70*-Promotor (Kraus *et al.*, 1992) und den humanen *p53*-Promotor (Dickopp, 2000). Kirch *et al.* (2002) konnten zeigen, dass verschiedene E1A-Konstrukte den humanen TERT-Promotor zelltypabhängig aktivieren oder reprimieren konnten, während die CR3EX2-, die EX2- und die SPEX-Mutante ebenfalls keinen Einfluss auf die Promotoraktivität hatten. Also zeigte sich auch hier wieder, dass E1A-Proteine mit einem intakten Aminoterminus potente Aktivatoren der Transkription von dem humanen TERT-Promotor darstellen (Kirch *et al.*, 2002). Allerdings wurde bereits gezeigt, dass die verschiedenen E1A-Konstrukte

den humanen TERT-Promotor zelltypabhängig aktivieren oder reprimieren (Kirch *et al.*, 2002). Möglicherweise beruhen die Unterschiede der Modulation des humanen TERT-Promotors durch E1A-Proteine in unterschiedlichen Zelllinien auf einer unterschiedlichen Expression endogener humaner TERT-Proteine (Dickopp, 2000). Die Spm2-Mutante stimuliert die Transkription des humanen TERT-Promotors als Transgen in malignen Zellen, ohne dass der endogene TERT in nicht-transformierten Fibroblasten aktiviert wird (Kirch *et al.*, 2002). Kirch *et al.* (2002) beschreiben aber auch, dass der im Rahmen dieser Arbeit verwendete humane TERT-Promotor mit einer Länge von 1665 bp schwächer aktiviert wird, als die del-208 und del-149-hTERT-Promotoren. Hinzu kommt, dass in der Melanomzelllinie MV-3 ebenfalls eine schwache Aktivierung des del-208-hTERT-Promotors durch Spm2-Mutante gezeigt wurde (Kirch *et al.*, 2002). E1A-Proteine sind in der Lage den hTERT zu aktivieren.

Um nun aber im Rahmen dieser Arbeit auszuschließen, dass die endogen exprimierten latenten Gene von HHV-8 die Funktionalität von E1A herabsetzen, wurden weitere Ko-Transfektionsexperimente durchgeführt. Dabei wurden sowohl die Spm2-Mutante mit LANA und dem WT LANAp kotransfiziert als auch Spm2-Mutante mit einem Expressionsvektor, der die drei latenten Gene vCyclin, vFLIP und LANA trägt, und dem WT LANAp. Diese Kotransfektionsexperimente zeigten keine Reduktion der Aktivierung des LANAp. Die von Jeong *et al.* (2004) beschriebene Aktivierung des LANAp durch das latente Antigen LANA in den HEK293-Zellen konnte in den MV3 nicht beobachtet werden. Möglicherweise liegen stromaufwärts des Transkriptionsstarts Bindungsstellen für Elemente, die für die Autoaktivierung des LANAp benötigt werden. Da die hier verwendeten Promotorkonstrukte nur bis 33 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts reichen, könnte dies eine Erklärung für die ausbleibende Autoaktivierung des LANAp sein.

E1A-Proteine üben stark unterschiedliche Effekte in der 3T3L1-Präadipozytenlinie aus, in Abhängigkeit der Expressionsrate (Cao *et al.*, 2005). Solche Dosiseffekte in Bezug auf die Genexpression müssen bedacht werden und sind zur Zeit noch Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion. Daher wird an einem induzierbaren transienten Transfektionssystem gearbeitet (Deissler *et al.*, unpublished).

Weiterhin sollte im Rahmen dieser Arbeit die Regulation des AP-2-Promotors durch E1A in MV-3-Zellen untersucht werden. Durch die Deletion der letzten Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor AP-2 auf dem LANAp eine niedrigere Basisaktivität beobachtet werden konnte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der LANAp, der

einige Bindestellen für den Transkriptionsfaktor AP-2 trägt, durch E1A aktiviert wird. Zudem ist bereits bekannt, dass der Transkriptionsfaktor AP-2 mit E1A-Proteinen interagiert. Zunächst sollte die Basisaktivität und damit die Funktionalität des AP-2-Promotors untersucht werden. Hier zeigte sich eine starke Basisaktivierung des AP-2-Promotors in der Melanomzelllinie MV3 verglichen mit einer schwachen Aktivierung in der Lungenkarzinomzelllinie H1299. Diese großen Unterschiede in Bezug auf die Basisaktivierung des AP-2-Promotors sind vermutlich dadurch zu erklären, dass es sich bei den Melanomzellen MV3 um eine Abstammung ektodermaler Zellen handelt. Bei dem Transkriptionsfaktor AP-2 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der hauptsächlich in ektodermalen Zelllinien exprimiert wird (Creaser *et al.*, 1996). Die Lungenkarzinomzellen H1299 sind dagegen mesodermale Zellen.

Hinzukommt, dass AP-2 ein Transkriptionsfaktor ist, der gewebespezifisch exprimiert wird (Creaser *et al.*, 1996).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der AP-2-Promotor durch die Spm2-Mutante nur schwach aktiviert wurde. Der AP-2-Promotor trägt selbst einige Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor AP-2 (Bauer *et al.*, 1994). Es wird angenommen, dass die Transkription des AP-2-Gens autoregulatorisch erfolgt, und dass dadurch Agenzien, die das AP-2-Protein inhibieren, auch die Expression des AP-2-Gens herabsetzen können (Creaser *et al.*, 1996). Die Expression der Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2; Kollagenase Typ IV) wird durch E1A-Proteine supprimiert, indem E1A-Genprodukte an den MMP-2-transaktivierenden Transkriptionsfaktor AP-2 binden (Somasundaram *et al.*, 1996). Möglicherweise ist durch sehr starke Basisaktivität des AP-2-Promotors in den MV-3-Zellen eine weitere Aktivierung durch E1A nicht mehr detektierbar ist.

#### **5.4 Einfluss von Ad12 E1A und Ad12 Spm2 auf die HHV-8-positiven B-Lymphozyten BC-3**

E1A-Proteine wurde bereits als Tumorsuppressoren beschrieben, der in Tumorzellen Apoptose induziert. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob E1A

Apoptose in den HHV-8-positiven Zellen induzieren kann, trotz der zuvor gezeigten Aktivierung des LANAp.

Jedoch konnte weder durch Ad12 13S bzw. Ad12 12S noch durch die Spm2-Mutante ein Einfluss auf die Proliferation der HHV-8-positiven Zellen festgestellt werden, obwohl die Induktion von Apoptose sowohl durch Ad12 E1A gezeigt werden konnte (Debbas und White, 1993). Der Spm2-Mutante konnte *in vivo* Tumorsuppressor-Funktionen nachgewiesen werden (Kirch *et al.*, unpublished). Ein Grund hierfür könnte sein, dass HHV-8 ein sehr großes Genom von 165 kb Länge besitzt, welches zahlreiche Gene trägt, durch deren Expression die Proliferation der Wirtszelle aufrechterhalten bleibt (Moore *et al.*, 1996; Russo *et al.*, 1996). Alleine die drei latenten Gene sind für die Aufrechterhaltung der Zellproliferation zuständig (Dittmer *et al.*, 1998). LANA interagiert mit dem p53-Protein, welches ein potenter Tumorsuppressor und Regulator des Zellzyklus ist. Die transkriptionelle Funktion von p53 als auch die durch diesen Tumorsuppressor induzierte Apoptose wird durch LANA inhibiert (Friborg *et al.*, 1999; Katano *et al.*, 2001).

Zellen, die vFLIP exprimieren, sind vor CD95- oder TNFR-1-induzierter Apoptose geschützt (Thome *et al.*, 1997). KSHV-FLIP inhibiert Fas-vermittelte Apoptose durch die Bindung an die Procaspase-8 und verhindert daher deren Reifung (Djerbi *et al.*, 1999; Belanger *et al.*, 2001). Folglich scheint vFLIP eine wichtige Rolle zu spielen in Bezug auf den Schutz KSHV-infizierter Zellen vor NK-Zellen (Curreli *et al.*, 2005).

Weiterhin kodiert KSHV für ein Protein mit Sequenz- und Funktionshomologie von humanem Bcl-2 (Sarid *et al.*, 1997). Mitglieder der Bcl-2-Familie spielen eine wichtige Rolle innerhalb der Gewebemöostase, Embryogenese und Immunantwort. Sie funktionieren entweder als Inhibitoren oder Promotoren von Apoptose (Thompson, 1995; Adams und Cory, 1998; Chao und Korsmeyer, 1998; Tsujimoto und Shimizu, 2000). Es wird angenommen, dass das von KSHV-kodierte Bcl-2 antiapoptotische Funktion besitzt (Huang *et al.*, 2002).

Wie oben bereits erwähnt, sind E1A-Proteine in der Lage, sowohl Apoptose in Zellen zu induzieren (White, 1995) als auch primäre Nagerzellen zu transformieren, wenn es zusammen mit einem Apoptoseinhibitor koexprimiert wird (White, 2001). E1B, das Genprodukt der frühen Region 1B, ist ein solcher Inhibitor der Apoptose und kodiert zwei Proteine, E1B 55K und E1B 19K. Beide Proteine können Apoptose inhibieren (White, 1995). Das E1B 19K-Protein ist ein anti-apoptotisches Bcl-2-Homolog (White, 2001), das auch den durch TNF- $\alpha$ -induzierten programmierten Zelltod überwindet

(White *et al.*, 1992). TNF- $\alpha$  ist ein multifunktionelles Zytokin, das von aktivierten Makrophagen und lymphoiden Zellen als Antwort auf inflammatorische Faktoren ausgeschüttet wird (Beutler und Cerami, 1986).

Die Überexpression von vBcl-2 blockiert die Induktion von Apoptose (Cheng *et al.*, 1997). Also ist es durchaus möglich, dass die Fähigkeit von Ad12 E1A Apoptose zu induzieren, in den HHV-8-positiven Zellen nicht ausgeprägt werden kann, da die gleichzeitige Expression von vBcl-2 dies verhindert.

E1A-Proteine sensibilisieren Zellen u.a. für Apoptose, indem es c-FLIPs inaktiviert (White, 2001). Solange jedoch E1B 19K (White, 2001) bzw. vBcl-2 im Falle von HHV-8 exprimiert wird, um die Induktion von Apoptose durch „Death Receptor“-Signalwege zu verhindern, kann die Virus-infizierte Zelle weiter proliferieren (White, 2001).

Hinzu kommt, dass HHV-8 vFLIP ORFK13 in der Lage ist, den NF- $\kappa$ B-Signalweg zu aktivieren (Matta *et al.*, 2003). Dadurch könnte die Sensibilisierung der HHV-8-positiven Zellen durch die von E1A induzierte TNF $\alpha$ -Apoptose nicht erfolgen.

Zudem bringt HHV-8 mehrere verschiedene Mechanismen mit, um die Induktion von Apoptose zu verhindern, wie Gene, die für die Chemokine IL-6, Macrophagen entzündliches Protein, einen Interferon-regulierenden Faktor, einen IL-8-Faktor und ein NCAM-ähnliches Protein kodieren (Moore *et al.*, 1996; Russo *et al.*, 1996).

Außerdem sind B-Zellen sowohl die Wirtszellen von Adenoviren als auch von Gammaherpesviren. Es wäre daher ungünstig, wenn einer der beiden Virenspezies Gene tragen würde, die der anderen Virenspezies schaden würden.

Allerdings müssen hier wieder die bereits oben beschriebenen Gen-Dosis-Effekte bedacht werden. Möglicherweise ist die Menge an exprimierten E1A-Proteinen zu gering, um Apoptose induzieren zu können (Cao *et al.*, 2005).

Möglicherweise kommt es in den HHV-8-positiven B-Lymphozyten aber auch zu einem Apoptose-Block, der unabhängig von HHV-8 ist.

Maligne Erkrankungen werden nach wie vor hauptsächlich mittels Chemotherapie behandelt. Obwohl verschiedene Zytostatika verschiedene Wirkmechanismen aufweisen, wird in den meisten Fällen Apoptose durch die Chemotherapeutika induziert (Fritsche *et al.*, 1993).

Zum einen entstehen schwere Nebenwirkungen durch die systemische Verabreichung hoher Dosen an zytotoxischen Substanzen und zum anderen werden auch nichtmaligne Zellen in Mitleidenschaft gezogen. Weiterhin kommt es häufig zu

einer Resistenzbildung der Tumorzellen, die während der Therapieintervalle zu großen Problemen führen.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte eine Sensibilisierung der HHV-8-infizierten Zellen durch Ad 12 E1A gegenüber der Behandlung mit Cyclophosphamid beobachtet werden. Es reichten bereits geringe Dosen an Cyclophosphamid aus, um die Anzahl der überlebenden Zellen nach der Behandlung zu reduzieren. Es konnte nicht festgestellt werden, weshalb für die Sensibilisierung gegenüber Cyclophosphamid, Ad12 E1A hinreichend wirksam ist, die Spm2-Mutante jedoch nicht. Da der einzige Unterschied zwischen Ad12 13S und Spm2-Mutante sechs Alanine innerhalb der „Spacer“-Region sind, lässt dies vermuten, dass der Wirkmechanismus von Cyclophosphamid mit der mangelnden p105-Rb-Bindung der Spm2-Mutante in Verbindung zu bringen ist. Sánchez-Prieto *et al.* (1995) zeigte in Bezug auf Ad5 E1A, dass die E1A-vermittelte Sensibilisierung gegenüber DNA-schädigenden Substanzen von der Bindung der Pocketproteine an E1A-Proteine abhängig ist. Für die Sensibilisierung der Zellen gegenüber Cisplatin wird die Fähigkeit der Bindung von p105, p107 und p300 an E1A-Proteine benötigt. Da eine dieser Bindungen (p105) in Bezug auf die Spm2-Mutante nicht mehr gegeben ist, könnte über diesen Weg keine Apoptose in den HHV-8-positiven Zellen induziert werden.

Allerdings konnte der molekulare Mechanismus der E1A-vermittelten Chemosensibilisierung bisher nicht aufgeklärt werden. Es wurden viele verschiedene Moleküle oder Signalwege, die an der Chemosensibilisierung durch E1A-Proteine beteiligt sind, aufgedeckt (Liao und Hung, 2003). Ein bereits beschriebener Weg ist dabei die erhöhte Expression einer Untereinheit (C) der Protein Phosphatase 2A durch E1A-Proteine in Mammakarzinomzellen. Diese erhöhte PP2A/C-Expression führt dann zu einer Repression der Akt-Aktivierung und damit zu der Chemosensibilisierung der Zellen (Liao und Hung, 2004). Die Sensibilisierung gegenüber Zytostatika durch E1A-Proteine erfolgt in unterschiedlichen Zelllinien durch verschiedene Mechanismen (Liao und Hung, 2003), so dass der Mechanismus der E1A-vermittelten Chemosensibilisierung in den HHV-8-positiven Lymphozyten gegenwärtig noch Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion ist.

Das hier untersuchte Zytostatikum Cyclophosphamid wird häufig als antineoplastisches Therapeutikum in der Therapie maligner Lymphome, multipler Myelome, Leukämien und anderen malignen Erkrankungen verwendet (Murata *et al.*,

2004). Cyclophosphamid übt seine Wirkung hauptsächlich über die Schädigung der DNA durch „Cross-linking“ zwischen den DNA-Strängen (Kawabata *et al.*, 1990) aus. Manche Zytostatika, die für die Therapie von Lymphomen verwendet werden, üben ihre zytotoxischen Effekte hauptsächlich durch Induktion von Apoptose aus (Wilson *et al.*, 1999). Adhäsive Interaktionen zwischen gleichen Zellarten tragen zu der Resistenzbildung gegenüber alkylierenden Agenzien bei. Cyclophosphamid gehört ebenfalls zu dieser Gruppe von alkylierenden Chemotherapeutika. Die Resistenzen entstehen u.a. durch Veränderung der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren, wie p27<sup>kip1</sup> (St. Croix *et al.*, 1996). Folglich nehmen St. Croix *et al.* (1996) an das p27-Antagonisten die Zellen für Chemotherapeutika sensibilisieren könnten. Es wurde bereits beschrieben, dass Ad5 E1A Zellen vor dem p27-induzierten Arrest bewahren kann. Für diese Funktion sind u.a. die pRb-Bindungsdomänen von E1A, wie die CR2, essentiell (Alevizopoulos *et al.*, 2000). Da die pRb-Bindungsfunktion bei Ad12 E1A intakt ist, im Gegensatz zu der Spm2-Mutante, ließe sich deshalb möglicherweise ein weiterer Mechanismus der, in dieser Arbeit, beobachteten Chemosensibilisierung durch Ad12 E1A erklären.

## 5.5 Ausblick und Zusammenfassung

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse liefern Ansatzpunkte für eine Vielzahl von weiterführenden Experimenten. So könnte in weiteren Untersuchungen festgestellt werden, ob die Bindung von E1A an CBP/p300 eine Rolle spielt.

Weiterhin könnte untersucht werden, aus welchen Gründen die Aktivierung des LANAp in den HHV-8-positiven Lymphozyten ausblieb. In diesem Zusammenhang könnten Untersuchungen angestrengt werden, um mögliche lymphogene regulatorische Elemente zu identifizieren, die die Aktivierung des LANAp durch E1A behindern und damit die Funktionalität der E1A-Proteine in B-Lymphozyten beeinträchtigen.

Auch das Ausbleiben des durch E1A-induzierten Zelltods in den HHV-8-positiven Lymphozyten könnte weiter untersucht werden. Möglicherweise müssten hier größere Dosen an E1A-cDNA eingesetzt werden, um Apoptose in den Zellen zu

induzieren, wie dies von Cao *et al.* (2005) beschrieben wurde. Zusätzlich könnte aber auch die Expression von NF- $\kappa$ B nach der Transfektion der HHV-8-positiven Lymphozyten mit E1A-cDNA überprüft werden, denn die Inhibierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B durch die E1A-vermittelte Suppression der I $\kappa$ B-Kinase (IKK) und damit der I $\kappa$ b $\alpha$ -Phosphorylierung führt zu TNF $\alpha$ -induzierter Apoptose (Shao *et al.*, 1999).

Ein weiterer Weg, Apoptose in HHV-8-positiven Zellen *in vitro* zu induzieren, ist die Überexpression von vCyklin. Dabei wird die Caspase-3 aktiviert (Ojala *et al.*, 1999). Daher könnte in weiteren Experimenten überprüft werden, ob durch die Transfektion von höheren Dosen Spm2-Mutante die Expression von vCyklin ausreichend ist, um die Caspase-3 zu aktivieren und damit Apoptose in den HHV-8-positiven Zellen zu induzieren.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Humane Herpesvirus 8 (HHV-8) wird mit der Entstehung des Kaposi-Sarkoms und anderer lymphoproliferativer Erkrankungen, wie das pleurale Effusionslymphom und Morbus Castleman, in Verbindung gebracht. HHV-8 infiziert Zellen des lymphatischen Systems, wie die Endothelzellen der Lymphgefäße und B-Zellen. Drei Proteine von HHV-8, das virale Cyklin, das virale FLIP und LANA werden benötigt, um die latente Phase der Infektion aufrecht zu erhalten. Diese drei Proteine sind Produkte verschiedener Spleißvarianten, die von einem primären RNA-Transkript exprimiert werden und unter der Kontrolle des LANAp stehen. Adenovirale E1A-Proteine sind in der Lage, Tumorwachstum und Metastasierung zu supprimieren, Zellen für Chemotherapeutika zu sensibilisieren und die Aktivität von verschiedenen zellulären und viralen Genen zu regulieren.

Es konnte unseres Wissens nach erstmalig gezeigt werden, dass E1A den LANAp in Melanomzellen signifikant regulieren und aktivieren kann. Darum kann der LANAp zu den vielen zellulären und viralen Promotoren, die durch E1A moduliert werden, hinzugefügt werden. An der Aktivierung des LANAp durch E1A sind maßgeblich die Transkriptionsfaktoren AP-2 und SP1 beteiligt.

Unter Verwendung von Deletionsmutanten von E1A konnte nachgewiesen werden, dass ein intakter N-Terminus von E1A mit den Aminosäuren 1 – 119 essentiell für die Aktivierung des LANAp durch E1A ist. Die konservierte Region 3 (CR3) von E1A

schien dabei nicht von Bedeutung zu sein, obwohl diese Region bisher als die Haupttransaktivierungs-Domäne beschrieben wurde.

Die Spm2-Mutante, in deren "Spacer"-Region sechs konsekutive Alaninreste deletiert wurden, aktivierte den LANAp ca. 15-fach gegenüber der Vektorkontrolle in der Melanomzelllinie MV3.

In HHV-8-positiven Lymphozyten konnte keine Regulation des LANAp durch E1A beobachtet werden. Möglicherweise wird die Funktionalität von E1A durch lymphogene regulatorische Elemente verursacht.

Da bereits beschrieben wurde, dass der LANAp durch LANA autoreguliert wird, wurden Expressionsvektoren, die sowohl LANA alleine als auch die drei latenten Gene (vCyclin, vFLIP und LANA) trugen, mit E1A-cDNA und LANAp kotransfiziert. Es konnte keine Minderung in Bezug auf die Aktivierung des LANAp durch E1A festgestellt werden.

Weiterhin konnte kein Hinweis auf einen möglichen Zelltod durch E1A in den HHV-8-positiven Lymphozyten gefunden werden.

Allerdings wurde die Sensibilisierung der BC-3-Zellen durch Ad12 E1A gegenüber dem Zytostatikum Cyclophosphamid beobachtet.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der LANAp durch E1A-Proteine mit intaktem N-Terminus in MV-3-Zellen aktiviert wird. Da aber eine Regulation des LANAp durch E1A in den HHV-8-positiven B-Lymphozyten ausblieb und auch das Überleben dieser Zellen durch die Transfektion von E1A-cDNA nicht verändert werden konnte, scheint E1A als Transgen in der Gentherapie HHV-8-assoziiierter Tumore nicht geeignet zu sein.

## 6 Literatur

Abraham, S.E.; Lobo, S.; Yaciuk, P.; Wang, H.G.; Moran, E. (1993). p300, and p300-associated proteins, are components of TATA-binding protein (TBP) complexes. *Oncogene* **8**, 1639

Adams, A. (1987). Replication of latent Epstein-Barr virus genome in Raji cells. *J Virol* **61**, 1743

Adams, J.M. and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322

Alevizopoulos, K.; Sanchez, B.; Amati, B. (2000). Conserved region 2 of adenovirus E1A has a function distinct from pRb binding required to prevent cell cycle arrest by p16<sup>INK4a</sup> or p27<sup>Kip1</sup>. *Oncogene* **19**, 2067

Arany, Z.; Newsome, D.; Oldread, E.; Livingston, D.M.; Eckner, R.; (1995). A family of transcriptional adaptor proteins targeted by the E1A oncoprotein. *Nature* **374**, 81

Arvanitakis, L.; Mesri, E.A.; Nador, R.G.; Said, J.W.; Asch, A.S.; Knowles, D.M.; Cesarman, E. (1996). Establishment and characterization of a primary effusion (body cavity- based) lymphoma cell line (BC-3) harboring kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in the absence of Epstein-Barr virus. *Blood* **88**, 2648

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

Ballestas, M.E.; Chatis, P.A.; Kaye, K.M. (1999). Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science* **284**, 641

Banks-Schlegel, S.P.; Gazdar, A.F.; Harris, C.C. (1985). Intermediate filament and cross-linked envelope expression in human lung tumor cell lines. *Cancer Res* **45**, 1187

Bauer, R.; Imhof, A.; Pscherer, A.; Kopp, H.; Moser, M.; Seegers, S.; Kerscher, M.; Tainsky, M.A.; Hofstaedter, F.; Buettner, R. (1994). The genomic structure of the human AP-2 transcription factor. *Nucleic Acids Res* **22**, 1413

Bayley, S. T. and Mymryk, J.S. (1994). Adenovirus E1A proteins and transformation (Review). *Int J Oncology* **5**, 425

Bechtel, J.T.; Liang, Y.; Hvidding, J.; Ganem, D. (2003). Host range of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in cultured cells. *J Virol* **77**, 6474

Belanger, C.; Gravel, A.; Tomoiu, A.; Janelle, M.E.; Gosselin, J.; Tremblay, M.J.; Flamand, L. (2001). Human herpesvirus 8 viral FLICE-inhibitory protein inhibits Fas-mediated apoptosis through binding and prevention of procaspase-8 maturation. *J Hum Virol* **4**, 62

Berk, A. J. (1986). Adenovirus promoters and E1A transactivation. *Ann Rev Genet* **20**, 45

Bertin, J.; Armstrong, R.C.; Otilie, S.; Martin, D.A.; Wang, Y.; Banks, S.; Wang, G.H.; Senkevich, T.G.; Alnemri, E.S.; Moss, B.; Lenardo, M.J.; Tomaselli, K.J.; Cohen, J.I. (1997). Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 1172

Beutler, B. and Cerami, A. (1986). Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* **320**, 584

Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* **7**, 1513

Boulakia, C.A.; Chen, G.; Ng, R.W.H.; Teodoro, J.G.; Branton, P.E.; Nicholson, D.W.; Poirier G.G.; Shore G.C. (1996). Bcl-2 and adenovirus E1B 19kDa protein prevent E1A-induced processing of CPP32 and cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase. *Oncogene* **12**, 529

Bower, M.; Fox, P.; Fife, K.; Gill, J.; Nelson, M.; Gazzard, B. (1999). Highly active antiretroviral therapy (HAART) prolongs time to treatment failure in Kaposi's sarcoma. *AIDS* **13**, 2105

Boyer, T.G.; Martin, M.E.D.; Lees, E.; Ricciardi, R.P.; Berk A.J. (1999). Mammalian Srb/mediator complex is targeted by adenovirus E1A protein. *Nature* **399**, 276

Brader, K.R.; Wolf, J.K.; Hung, M.C.; Yu, D.; Crispens, M.A.; van Golen, K.L.; Price, J.E. (1997). Adenovirus E1A expression enhances the sensitivity of an ovarian cancer cell line to multiple cytotoxic agents through an apoptotic mechanism. *Clin Cancer Res* **3**, 2017

Braun, T.; Bober, E.; Buschhausen-Denker, G.; Kohtz, S.; Grzeschik, K.H.; Arnold, H.H. (1989). Differential expression of myogenic determination genes in muscle cells: possible autoactivation by the Myf gene products. *EMBO J* **8**, 3617

Brockmann, D.; Tries, B.; Esche, H. (1990). Isolation and characterisation of novel adenovirus type 12 E1A mRNAs by cDNA cloning. *Virology* **179**, 585

Brockmann, D. and 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

Bühl, A. und Zöfel, P. (1994). *SPSS für Windows Version 6: Praxisorientierte Einführung in die moderne Datenanalyse*. Addison-Wesley Publishing Company.

Bubman, D. and Cesarman, E. (2003). Pathogenesis of Kaposi's sarcoma. *Hematol Oncol Clin North Am* **17**, 717

Cao, J.; Arulanandam, R.; Vultur, A.; Preston, T.; Jaronczyk, K.; Tomai, E.; Zandi, K.; Raptis, L. (2005). Adenovirus-5 E1A suppresses differentiation of 3T3 L1 preadipocytes at lower levels than required for induction of apoptosis. *Mol Carcinog* Mar 14 [Epub ahead of print]

Cathomas, G. (2003). Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus (KSHV)/Human Herpesvirus 8 (HHV-8) as a Tumour Virus. *Herpes* **10**, 72

Cesarman, E.; Chang, Y.; Moore, P.S.; Said, J.W.; Knowles, D.M. (1995). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body cavity-based lymphomas. *N Engl J Med* **332**, 1186-1191

Cesarman, E.; Nador, R.G.; Bai, F.; Bohenzky, R.A.; Russo, J.J.; Moore, P.S.; Chang, Y.; Knowles, D.M. (1996). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus contains G protein-coupled receptor and cyclin D homologs which are expressed in Kaposi's sarcoma and malignant lymphoma. *J Virol* **70**, 8218

Cesarman, E. and Knowles, D.M. (1997). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: a lymphotropic human herpesvirus associated with Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castelman's disease. *Sem Diagn Pathol* **14**, 54

Chang, Y.; Cesarman, E.; Pessin, M.S.; Lee, F.; Culpepper, J.; Knowles, D.M.; Moore, P.S. (1994). Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* **266**, 1865

Chang, Y.; Moore, P.S.; Talbot, S.J.; Boshoff, C.H.; Zarkowska, T.; Godden, K.; Paterson, H.; Weiss, R.A.; Mitnacht, S. (1996). Cyclin encoded by KS herpesvirus. *Nature* **382**, 410

Chao, D.T. and Korsmeyer, S.J. (1998). BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* **16**, 395

Chellappan, S.P. and Nevins, J.R. (1990). DNA octamer element can confer E1A trans-activation, and adenovirus infection results in a stimulation of the DNA-binding activity of OTF-1/NFIII factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5878

Chen, H.; Yu, D.; Chinnadurai, G.; Karunakaran, D.; Hung, M.-C. (1997). Mapping of adenovirus 5 E1A domains responsible for suppression of neu-mediated transformation via transcriptional repression of neu. *Oncogene* **14**, 1965

Cheng, E.H.; Nicholas, J.; Bellows, D.S.; Hayward, G.S.; Guo, H.G.; Reitz, M.S.; Hardwick, J.M. (1997). A Bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcoma-associated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 690

Chinnadurai, G. (1992). Adenovirus E1a as a tumor-suppressor gene. *Oncogene* **7**, 1255

Chiou, S.K. and White, E. (1997). p300 binding by E1A cosegregates with p53 induction but is dispensable for apoptosis. *J Virol* **71**, 3515

Coleman, A.B.; Metz, M.Z.; Donohue, C.A. ; Schwarz, R.E. ; Kane, S.E. (2002). Chemosensitization by fibroblast growth factor-2 is not dependent upon proliferation, S-phase accumulation, or p53 status. *Biochem Pharmacol* **64**, 1111

Creaser, P.C.; D'Argenio, D.A.; Williams, T. (1996). Comparative and functional analysis of the AP2 promoter indicates that conserved octamer and initiator elements are critical for activity. *Nucleic Acids Res* **24**, 2597

Curreli, F.; Robles, M.A.; Friedman-Kien, A.E.; Flore, O. (2003). Detection and quantitation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) by a single competitive-quantitative polymerase chain reaction. *J Virol Methods* **107**, 261

Curreli, F.; Friedman-Kien, A.E.; Flore, O. (2005). Glycyrrhizic acid alters Kaposi sarcoma-associated herpesvirus latency, triggering p53-mediated apoptosis in transformed B lymphocytes. *J Clin Invest* **115**, 642

Damania, B. (2004). Oncogenic  $\gamma$ -Herpesviruses: Comparison of viral proteins involved in Tumorigenesis. *Nat Rev Microbiol* **2**, 656

Debbas, M. and White, E. (1993). Wild type p53 mediates apoptosis by E1A which is inhibited by E1B. *Genes Dev* **7**, 546

Deeks, S.G.; Hecht, F.M.; Swanson, M.; Elbeik, T.; Loftus, R.; Cohen, P.T.; Grant, R.M. (1999). HIV RNA and CD4 cell count response to protease inhibitor therapy in an urban AIDS clinic: response to both initial and salvage therapy. *AIDS* **13**, F35

Deng, J.; Xia, W.; Hung, M.C. (1998). Adenovirus 5 E1A-mediated tumor suppression associated with E1A-mediated apoptosis in vivo. *Oncogene* **17**, 2167

Dickopp A. (2000). Evaluation der Tumorsuppressoraktivität transformationsdefekter Adenovirus-Serotyp 5 E1A-Mutanten. Inaugural-Dissertation des Fachbereiches Geo- und Biowissenschaften, Landschaftsarchitektur an der Universität-Gesamthochschule Essen.

Dickopp, A.; Esche, H.; Swart, G.; Seeber, S.; Kirch, H.C.; Opalka, B. (2000). Transformation-defective adenovirus 5 E1A mutants exhibit antioncogenic properties in human BLM melanoma cells. *Cancer Gene Ther* **7**, 1043

Dittmer, D.; Lagunoff, M.; Renne, R.; Staskus, K.; Haase, A.; Ganem, D. (1998). A cluster of latently expressed genes in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* **72**, 8309

Djerbi, M.; Screpanti, V.; Catrina, A.I.; Bogen, B.; Biberfeld, P.; Grandien, A. (1999). The inhibitor of death receptor signaling, FICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *J Exp Med* **190**, 1025

Dourmishev, L.A.; Dourmishev, A.L.; Palmeri, D.; Schwartz, R.A.; Lukac, D.M. (2003). Molecular Genetics of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8) Epidemiology and Pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 2003

Dupin, N; Diss, T.L.; Kellam, P.; Tulliez, M.; Du, M.Q.; Sicard, D.; Weiss, R.A.; Isaacson, P.G.; Boshoff, C. (2000). HHV-8 is associated with a plasmablastic variant of Castleman disease that is linked to HHV-8-positive plasmablastic lymphoma. *Blood* **95**, 1406

Duyndam, M.C.; van Dam, H.; van der Eb, A.J.; Zantema, A. (1996). The CR1 and CR3 domains of the adenovirus type 5 E1A proteins can independently mediate activation of ATF-2. *J Virol* **70**, 5852

Duyndam, M.C.A.; van Dam, H.; Smits, P.H.M.; Verlaan, M.; van der Eb, A.J.; Zantema, A. (1999). The N-terminal transactivation domain of ATF2 is a target for the co-operative activation of the *c-jun* promoter by p300 and 12S E1A. *Oncogene* **18**, 2311

Epstein, M.A.; Achong, B.; Barr, Y. (1964). Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* **1**, 702

Fax, P.; Lehmkuhler, O.; Kühn, C.; Esche, H.; Brockmann, D. (2000). *J Biol Chem* **51**, 40554

Fearnhead, H. O.; Rodriguez, J.; Govek, E.-E.; Guo, W.; Kobayashi, R.; Hannon, G.; Lazebnik Y. A. (1998). Oncogene-dependent apoptosis is mediated by caspase-9. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 13664

Ferguson, B.; Kripple, B.; Andrisani, O.; Jones, N.; Westphal, H.; Rosenberg, M. (1985). E1A 13S and 12S mRNA products made in *Escherischia coli* both function as nucleus-localized transcription activators but do not directly bind DNA. *Mol Cell Biol* **5**, 2653

Fleury, H.J.A. (2002). *Virologie humaine*. In: Collection Abrégés, 4 ème édition, Masson

Foreman, K.E.; Friborg Jr., J.; Kong, W.P.; Woffendin, C.; Polverini, P.J.; Nickoloff, B.J.; Nabel, G.J. (1997). Propagation of a human herpesvirus from AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *N Engl J Med* **336**, 163

Foreman, K.E. (2001). Kaposi's sarcoma: the role of HHV-8 and HIV-1 in pathogenesis. *Expert Rev Mol Med* **2001**, 1

Friberg, J., Jr.; Kong, W.; Hottinger, M.O.; Nabel, G.J. (1999). P53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death. *Nature* **402**, 889

Frisch, S.M. (1991). Antioncogenic effect of adenovirus E1A in human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 9077

Frisch, S.M. and Dolter, K.E. (1995). Adenovirus E1A-mediated tumor suppression by a c-erbB-2/neu-independent mechanism. *Cancer Res* **55**, 5551

Frisch, S.M. and Mymryk, J.S. (2002). Adenovirus-5 E1A. paradox and paradigm. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 441

Fritsche, M.; Haessler, C.; Brandner, G. (1993). Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene* **8**, 307

Furlong, E.E.; Rein, T.; Martin, F. (1996). YY1 and NF1 both activate the human p53 promoter by alternatively binding to a composite element, and YY1 and E1A cooperate to amplify p53 promoter activity. *Mol Cell Biol* **16**, 5933

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

Garber, A.C.; Hu, J., Renne, R. (2002). Latency-associated nuclear antigen (LANA) cooperatively binds to two sites within the terminal repeat, and both sites contribute to the ability of LANA to suppress transcription and to facilitate DNA replication. *J Biol Chem* **277**, 27401

Gazdar, A.F.; Steinberg, S.M.; Russel, E.K.; Linnoila, R.I.; Oie, H.K.; Ghosh, B.C.; Coelingam, J.D.; Johnson, B.E.; Minna, J.D.; Ihde, D.C. (1990). Correlation of in vitro drug-sensitivity testing results with response to chemotherapy and survival in extensive-stage small cell lung cancer: a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* **82**, 117

Georgopoulos, K.; Moore, D.D.; Derfler, B. (1992). Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. *Science* **258**, 808

Gessain, A.; Sudaka, A.; Brière, J.; Fouchard, N.; Nicola, M.A.; Rio, B.; Arborio, M.; Troussard, X.; Ausouin, J.; Diebold, J.; de Thé, G. (1995). Kaposi sarcoma-associated herpes-like virus (Human Herpesvirus Type 8) DNA sequences in multicentric Castleman's disease: Is there any relevant association in non-human immunodeficiency virus-infected patients? (Letter to the Editor). *Blood* **95**, 414

Getman, D.K.; Mutero, A.; Inoue, K.; Taylor, P. (1995). Transcription factor repression and activation of the human acetylcholinesterase gene. *J Biol Chem* **272**, 29120

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

Ginsberg, H.S. (1999). The life and times of adenoviruses. *Adv Virus Res* **54**, 1

Godden-Kent, D.; Talbot, S.J.; Boshoff, C.; Chang, Y.; Moore, P.; Weiss, R.A.; Mittnacht, S. (1997). The cyclin encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus stimulates cdk6 to phosphorylate the retinoblastoma protein and histone H1. *J Virol* **71**, 4193

Graham, F.L.; van der Eb, A.J.; Heijneker, H.L. (1974). Size and location of the transforming region in human adenovirus type 5 DNA. *Nature* **251**, 687

Graham, F.L.; Smiley, J.; Russell, W.C.; Nairn, R. (1977). Characterization of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59

Gross, A.; McDonnell, J.M.; Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **13**, 1899

Grundhoff, A. and Ganem, D. (2003). The Latency-Associated Nuclear Antigen of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Permits Replication of Terminal Repeat-Containing Plasmids. *J Virol* **77**, 2779

Günzburg, W.H. und Salomons, B. (1997). Gentransfer in Säugetierzellen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg – Berlin, S. 139 ff.

Guo, M. and Hay B.A. (1999). Cell proliferation and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 745

Hahm, K.; Ernst, P.; Lo, K.; Kim, G.S.; Turck, C.; Smale, S.T. (1994). The lymphoid transcription factor LyF-1 is encoded by specific, alternatively spliced mRNAs derived from the Ikaros gene. *Mol Cell Biol* **14**, 7111

Hayward, G. (2003). Initiation of angiogenic Kaposi's sarcoma lesions. *Cancer Cell* **3**, 1

Hortobagyi, G.N.; Ueno, N.T.; Xia, W.; Zhang, S.; Wolf, J.K.; Putnam, J.B.; Weiden, P.L.; Willey, J.S.; Carey, M.; Branham, D.L.; Payne, J.Y.; Tucker, S.D.; Bartholomeusz, C.; Kilbourn, R.G.; De Jager, R.L.; Sneige, N.; Katz, R.L.; Anklesaria, P.; Ibrahim, N.K.; Murray, J.L.; Theriault, R.L.; Valero, V.; Gershenson, D.M.; Bevers, M.W.; Huang, L.; Lopez-Berestein, G.; Hung, M.C. (2001). Cationic liposome-mediated E1A gene transfer to human breast and ovarian cancer cells and its biologic effects: a phase I clinical trial. *J Clin Oncol* **19**, 3422

Horvath, J.; Faxing, C.; Weber, J.M. (1991). Complementation of adenovirus early region 1a and 2a mutants by Epstein-Barr virus immortalized lymphoblastoid cell lines. *Virology* **184**, 141

Horwitz, M.S. (1990). In: *Virology* (2nd ed.), (ed. B.N. Fields), D.M. Knipe et al. Raven Press, New York, USA : 1679

Houweling, A.; van den Elsen, P.J.; 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

Huang, Q.; Petros, A.M.; Virgin, H.W.; Fesik, S.W.; Olejniczak, E.T. (2002). Solution structure of a Bcl-2 homolog from Kaposi sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3428

Inostroza, J.S. ; Mermelstein, F.S. ; Ha, I. ; Lane, W.S. ; Reinberg, D. (1992). DR1, a TATA-binding protein-associated phosphoprotein and inhibitor of class II gene transcription. *Cell* **70**, 477

Jelsma, T.N.; Howe, J.A.; Mymryk, J.S.; Eveleigh, C.M.; Cuniff, N.F.A.; Bayley, S.T. (1989). Sequences in E1A proteins of human adenovirus 5 required for cell transformation, repression of a transcriptional enhancer, and induction of proliferating cell nuclear antigen. *Virology* **171**, 120

Jeong, J. ; Papin, J. ; Dittmer, D. (2001). Differential Regulation of the Overlapping Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus vGCR (orf74) and LANA (orf73) Promoters. *J Virol* **75**, 1798

Jeong, J.H. ; Orvis, J. ; Kim, J.W.; McMurtry, C.P.; Renne, R.; Dittmer, D.P. (2004). Regulation and Auto-regulation of the promotor for the latency-associated nuclear antigen (LANA) of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Biol Chem* **279**, 16822

Katano, H., Sato, Y.; Sata, T. (2001). Expression of p53 and human herpesvirus-8 (HHV-8)-encoded latency-associated nuclear antigen with inhibition of apoptosis in HHV-8-associated malignancies. *Cancer* **92**, 3076

Kawabata, T.T.; Chapman, M.Y. ; Kim, D.H. ; Stevens, W.D. ; Holsapple, M.P. (1990). Mechanisms of in vitro immunosuppression by hepatocyte-generated cyclophosphamide metabolites and 4-hydroperoxycyclophosphamide. *Biochem Pharmacol* **40**, 927

Keller, S.A. ; Schattner, E.J.; Cesarman, E. (2000). Inhibition of NF-kappaB induces apoptosis of KSHV-infected primary effusion lymphoma cells. *Blood* **96**, 2537

Kido, Y.; Mitsudomi, T.; Kuwano, H.; Maehara, Y.; Sugimachi, K. (1991). Different chemosensitivities of rat 3Y1 fibroblasts transformed by various agents in vitro. *Anticancer Res* **11**, 1305

Kim, H.S ; Lee, J.K. ; Tsai, S.Y. (1995). E1a activation of insulin receptor gene expression is mediated by SP1-binding sites. *Mol Endocrinol* **9**, 178

Kirch, H.C.; Ruschen, S.; Brockmann, D.; Esche, H.; Horikawa, I.; Barrett, J.C.; Opalka, B.; Hengge, U.R. (2002). Tumor-specific activation of hTERT-derived promoters by tumor suppressive E1A-mutants involves recruitment of p300/CBP/HAT and suppression of HDAC-1 and defines a combined tumor targeting and suppression system. *Oncogene* **21**, 7991

Kischkel, F.C.; Hellbarth, S.; Behrmann, I.; Germer, M.; Pawlita, M.; Krammer, P.H.; Peter M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* **15**, 5579

Klein, G. (1994). Epstein-Barr virus strategy in normal and neoplastic B cells. *Cell* **77**, 791

Kraus, V.B.; Moran, E.; Nevins, J.R. (1992). Promotor-Specific *trans*-Acitvation by the Adenovirus E1A<sub>12S</sub> Product Involves Separate E1A Domains. *Mol Cell Biol* **12**, 4391

Kraus, V.B.; Inostroza, J.A.; Yeung, K.; Reinberg, D.; Nevins, J.R. (1994). Interaction of the Dr1 inhibitory factor with the TATA binding protein is disrupted by adenovirus E1A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 6279

Krippel, B.; Ferguson, B.; Rosenberg, M; Westphal H. (1984). Functions of purified E1A protein microinjected into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 6988

Laemmli U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680

Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**, 323

Levine, A.M. and Feigel, E. (2000). Conference Report: 4<sup>th</sup> International AIDS Malignancy Conference. <http://hiv.medscape.com/Medscape/HIV/journal/2000/v06.n03/mha0627.levi/mha0627.Levine-01.html>

Liao, Y. und Hung, M.C. (2003). Regulation of the activity of p38 mitogen-activated protein kinase by Akt in cancer and adenoviral protein E1A-mediated sensitization to apoptosis. *Mol Cell Biol* **23**, 6836

Lillie, J.W.; Loewenstein, P.M.; Green, M.R.; Green, M. (1987). Functional domains of adenovirus type 5 E1A proteins. *Cell* **50**, 1091

Lillie, J.W. and Green, M.R.; (1989). Transcription activation by the adenovirus E1a protein. *Nature* **338**, 39

Liu, F. and Green, M.R. (1994). Promoter targeting by adenovirus E1a through interaction with different cellular DNA-binding domains. *Nature* **368**, 520

Liu, L.; Eby, M.T.; Rathore, N.; Sinha, S.K.; Kumar, A.; Chaudhary, P.M. (2002). The human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein physically associates with and persistently activates the I $\kappa$ B kinase complex. *J Biol Chem* **277**, 13745

Lowe, S.W. and Ruley, H.E. (1993). Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus-5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev* **7**, 535

Lowe, S.W.; Ruley, H.E.; Jacks, T.; Housman, D.E. (1993B). P53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* **74**, 957

Lundblad, J.R.; Kwok, R.P.S.; Laurance, M.E.; Harter, M.L.; Goodman, R.H. (1995). Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP. *Nature* **374**, 85

Lyons, R.H.; Ferguson, B.Q.; Rosenberg, M. (1987). Pentapeptide nuclear localization signal in Adenovirus E1a. *Mol Cell Biol* **7**, 2451

Madhusudan, S.; Tamir, A.; Bates, N.; Flanagan, E.; Gore, M.E.; Barton, D.P.; Haper, P.; Seckl, M.; Thomas, H.; Lemoine, N.R.; Charnock, M.; Habib, N.A.; Lechler, R.; Nicholls, J.; Pignatelli, M.; Ganesan, T.S. (2004). A multicenter Phase I gene therapy clinical trial involving intraperitoneal administration of E1A-lipid complex in patients with recurrent epithelial ovarian cancer overexpressing HER-2/neu oncogene. *Clin Cancer Res* **10**, 2986

Matsuoka, Y.; Moore, G.E.; Yagi, Y., Pressman, D. (1967). Production of free light chains of immunoglobulin by a hematopoietic cell line derived from a patient with multiple myeloma. *Proc Soc Exp Biol Med* **125**, 1246

Matta, H.; Sun, Q.; Moses, G.; Chaudhary, P.M. (2003). Molecular Genetic Analysis of Human Herpes Virus 8-encoded Viral FLICE Inhibitory Protein-induced NF- $\kappa$ B Activation. *J Biol Chem* **278**, 52406

Meier, O. and Greber, U.F. (2004). Adenovirus endocytosis. *J Gene Med* **6 Suppl 1**, S152

Melendez, L.V; Daniel, M.D.; Hunt, R.D.; Garcia, F.G. (1968). An apparently new herpesvirus from primary kidney cultures of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Lab Anim Care* **18**, 374

Metcalf, J.P.; Monick, M.M.; Stinski, M.F.; Hunninghake, G.W. (1994). Adenovirus E1A 13S gene product up-regulates the cytomegalovirus major immediate early promoter. *Am J Respir Cell Mol Biol* **10**, 448

Mitchell, P.J.; Timmons, P.M.; Hébert, J.M., Rigby, P.W.J. Tjian, R. (1991). Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. *Genes Dev* **5**, 105

Moore, P.S.; Boshoff, C.; Weiss, R.A.; Chang, Y. (1996). Molecular mimicry of human cytokine and cytokine-response pathway genes by KSHV. *Science* **274**, 1739

Moran, E.; Zerler, B.; Harrison, T.M.; Mathews, M.B. (1986). Identification of separate domains in the adenovirus E1A gene for immortalization activity and the activation of virus early genes. *Mol Cell Biol* **6**, 3470

Moran, E. (1993). DNA tumor virus transforming proteins and the cell cycle. *Curr. Opin Genet Dev* **3**, 63

Mosialos, G. (1997). The role of Rel/NF-kappa B proteins in viral oncogenesis and the regulation of viral transcription. *Semin Cancer Biol* **8**, 121

Mullis, K. ; Falcoona, F. ; Scharf, S. ; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Biotechnology* **24**, 17

Murata, M.; Suzuki, T.; Midorikawa, K.; Oikawa, S.; Kawanishi, S. (2004). Oxidative DNA Damage induced by a Hydroperoxide Derivative of Cyclophosphamide. *Free Radic Biol Med* **37**, 793

Muzio, M.; Stockwell, B.R.; Stennicke, H.R.; Salvesen, G.S.; Dixit V.M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* **30**, 2926

Mymryk, J.S.; Lee, R.W.H.; Bayley S.T. (1994). Induction of apoptosis by adenovirus type 5 E1A in rat cells requires a proliferation block. *Oncogene* **9**, 1187

Mymryk, J.S. (1996). Tumour suppressive properties of the adenovirus 5 E1A oncogene. *Oncogene* **13**, 1581

Nakajima, T.; Morita, K.; Tsundona, H.; Imajoh-Ohmi, S.; Tanaka, H.; Yasuda, H.; Oda K. (1998). Stabilization of p53 by adenovirus E1A occurs through its aminoterminal region by modification of the Ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem.* **273**, 20036

Neumann, S. (2004). Regulation des Promotors der menschlichen Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) durch tumorsupprimierende E1A-Derivate. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum, Fachbereich Biochemie

Nevins, J.R. Adenovirus E1A-dependent transactivation of transcription. (1990). *Cancer Biol* **1**, 59

Nguyen, M.; Branton, P.E.; Roy, S.; Nicholson, D. W.; Alnemri, E. S.; Yeh, W.-C.; Mak T. W.; Shore G. C. (1998). E1A-induced processing of procaspase-8 can occur independently of FADD and is inhibited by Bcl-2. *J Biol Chem* **273**, 33099

Nietfeld, W. and Meyerhans A. (1996). Cloning and sequencing of hlk-1, a cDNA encoding a human homologue of mouse Ikaros/LyF-1. *Immunol Lett* **49**, 139

Offermann, M.K. (1996). HHV-8: a new herpesvirus associated with Kaposi's sarcoma. *Trends Microbiol* **4**, 383

Ojala, P.M.; Tiainen, M.; Salven, P.; Veikkola, T.; Castanos-Velez, E.; Sarid, R.; Biberfeld, P.; Makela, T.P. (1999). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded v-cyclin triggers apoptosis in cells with high levels of cyclin-dependent kinase 6. *Cancer Res* **59**, 4984

Payne, K.J.; Nicolas, J.H.; Zhu, J.Y.; Barsky, L.W.; Crooks, G.M. (2001). Cutting Edge: Predominant Expression of a Novel Ikaros Isoform in Normal Human Hemopoiesis. *J Immunol* **167**, 1867

Pei, R. and Berk, A.J. (1989). Multiple transcription factor binding sites mediate adenovirus E1A transactivation. *J Virol* **63**, 3499

Persson, H. and Philipson, L. (1982). Regulation of adenovirus gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* **97**, 157

Radkov, S.A.; Kellam, P.; Boshoff, C. (2000). The latent nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus targets the retinoblastoma-E2F pathway and with the oncogene Hras transforms primary rat cells. *Nat Med* **91**, 3825

Reed, J.A.; Nador, R.G.; Spaulding, D.; Tani, Y.; Cesarman, E.; Knowles, D.M. (1998). Demonstration of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus cyclin D homolog in cutaneous Kaposi's sarcoma by colorimetric in situ hybridisation using a catalysed signal amplification system. *Blood* **91**, 3825

Renne, R.; Lagunoff, M.; Zhong, W.; Ganem, D. (1996). The size and conformation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in infected cells and virions. *J Virol* **70**, 8151

Renne, R., Zhong, B.; Herndier, M.; McGrath, N.; Abbey, D.; Kedes, D.; Ganem, D. (1996B). Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture. *Nat Med* **2**, 342

Renne, R.; Blackbourn, D.; Whitby, D.; Levy, J.; Ganem, D. (1998). Limited transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in cultured cells. *J Virol* **72**, 5182

Roizman, B. (1993). The family Herpesviridae, p. 1-9. In B. Roizman, R. J. Whitley and C. Lopez (ed.), *The human herpesviruses*. Raven Press, Ltd., New York, N.Y.

Rowe, W.P.; Huebner, R.J.; Gillmore, L.K.; Parrott, R.H.; Ward, T.G. (1953). Isolation of cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Bio Med* **84**, 570

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

Rumpf, H.; Esche, H.; Kirch, H.C. (1999). Two domains within the adenovirus type 12 E1A unique spacer have disparate effects on the interaction of E1A with P105-Rb and the transformation of primary mouse cells. *Virology* **257**, 45

Russo, J.J.; Bohenzky, R.A.; Chien, M.C.; Chen, J.; Yan, M.; Maddalena, D.; Parry, J.P.; Peruzzi, D.; Edelman, I.S.; Chang, Y.; Moore, P.S. (1996). Nucleotide Sequence of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 14862

Samuelson, A.V. and Lowe, S.W. (1997). Selective induction of p53 and chemosensitivity in RB-deficient cells by E1A mutants unable to bind the RB-related proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 12094

Sánchez-Prieto, R.; Leonart, M.; Ramon y Cajal, R. (1995). Lack of correlation between p53 protein level and sensitivity of DNA-damaging agents in keratinocytes carrying adenovirus E1a mutants. *Oncogene* **11**, 675

Sánchez-Prieto, R.; Quintanilla, M.; Cano, A.; Leonart, A.; Martin, P.; Anaya, A.; Ramon y Cajal, S. (1996). Carcinoma cell lines become sensitive to DNA-damaging agents by the expression of the adenovirus E1A gene. *Oncogene* **13**, 1083

Sano, Y.; Tokitou, F.; Dai, P.; Maekawa, T.; Yamamoto, T.; Ishii, S. (1998). CBP alleviated the intramolecular inhibition of ATF-2 function. *J. Biol. Chem.* **273**, 29098

Sarid R.; Sato, T.; Bohenzky, R.A.; Russo, J.J.; Chang, Y. (1997). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional bcl-2 homologue. *Nat Med* **3**, 293

Sarid, R.; Flore, O.; Bohenzky, R.; Chang, Y.; Moore, P.S. (1998). Transcription Mapping of the Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8) Genome in a Body Cavity-Based Lymphoma Cell Line (BC-1). *J Virol* **72**, 1005

Sarid, R.; Wiezorek, J.S.; Moore, P.S.; Chang, Y. (1999). Characterization and Cell Cycle Regulation of the Major Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8) Latent Genes and Their Promoter. *J. Virol* **73**, 1438

Schaak, J. and Shenk, T. (1989). Adenovirus terminal protein mediated efficient and timely activation of viral transcription. *Curr Top Microbiol Immunol* **144**, 185

Schaeper, U.; Boyd, J.M.; Verma, S.; Uhlmann, E.; Subramanian, T., Chinnadurai G. (1995). Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved carboxyterminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 10467

Schneider, J.F.; Fisher, F.; Goding, C.R.; Jones, N.C. (1987). Mutational analysis of the adenovirus E1a gene: the role of transcriptional regulation in transformation. *EMBO J* **6**, 2053

Schuirer, M.; Hilger-Eversheim, K.; Dobner, T.; Bosserhoff, A.K.; Moser, M.; Turner, J.; Crossley, M.; Büttner, R. (2001). *J Biol Chem* **276**, 27944

Schwam, D.R.; Luciano, R.L.; Mahajan, S.S.; Wong, L.; Wilson, A.C. (2000). Carboxy terminus of human herpesvirus 8 latency-associated nuclear antigen mediates dimerization, transcriptional repression, and targeting to nuclear bodies. *J Virol* **74**, 8532

Shao, R.; Karunagaran, D.; Zhou, B.P.; Li, K.; Lo, S.S.; Deng, J.; Chiao, P.; Hung, M.C. (1997). Inhibition of Nuclear Factor- $\kappa$ B Activity is involved in E1A-mediated Sensitization of Radiation-induced Apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 32739

Shao, R.; Hu, M.C.T.; Zhou, B.P.; Lin, S.Y.; Chiao, P.J.; von Lindern, R.H.; Sphon, B.; Hung, M.C. (1999). E1A Sensitizes Cells to Tumor Necrosis Factor-induced Apoptosis through Inhibition of I $\kappa$ B Kinases and Nuclear Factor  $\kappa$ B Activities. *J Biol Chem* **274**, 21495

Shenk, T. (1996). Adenoviridae: The viruses and their replication. *Fundamental Virology*, Third edition: 979

Slansky, J.E. and Farnham P.J. (1996). Introduction to the E2F family: protein structure and gene regulation. *Curr Top Microbiol Immunol* **208**, 1

Sollerbrant, K.; Chinnadurai, G.; Svensson, C. (1996). The CtBP binding domain in the adenovirus E1A protein controls CR1-dependent transactivation. *Nucleic Acids Res* **24**, 257

Somasundaram, K.; Jayaraman, G.; Williams, T.; Moran, E.; Frisch, S.; Thimmapaya, B. (1996). Repression of a matrix metalloprotease gene by E1A correlates with its ability to bind to cell type-specific transcription factor AP-2. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 3088

Song, C.Z.; Tierney, C.J.; Loewenstein, P.M.; Pusztai, R.; Symington, J.S.; Tang, Q.Q.; Toth, K.; Nishikawa, A.; Bayley, S.T.; Green, M. (1995). Transcriptional repression by human adenovirus E1A N terminus/conserved domain 1 polypeptides in vivo and in vitro in the absence of protein synthesis. *J Biol Chem* **270**, 23263

St. Croix, B.; Florenes, V.A.; Rak, J.W.; Flanagan, M.; Bhattacharya, N.; Slingerland, J.M.; Kerbel, R.S. (1996). Impact of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>kip1</sup> on resistance of tumor cell to anticancer agents. *Nature Med* **2**, 1204

Ström, A.C.; Ohlsson, P., Akusjärvi, G. (1998). AR1 is an integral part of the Adenovirus Type 2 E1A-CR3 Transactivation Domain. *J. Virol* **72**, 5978

Struhl, K. (1998) Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* **12**, 599

Sturzl, M.; Hohenadl, C.; Zietz, C.; Castanos-Velez, E.; Wunderlich, A.; Ascherl, G.; Biberfeld, P.; Monini, P.; Browning, P.J.; Ensoli, B.(1999). Expression of K13/v-FLIP gene of human herpesvirus 8 and apoptosis in Kaposi's sarcoma spindle cells. *J Natl Cancer Inst* **91**, 1725

Subramanian, T.; La Regina, M.; Chinnadurai, G. (1989). Enhanced ras oncogene mediated cell transformation and tumorigenesis by adenovirus 2 mutants lacking the C-terminal region of E1a protein. *Oncogene* **4**, 415

Suggs, S.V.; Wallace, R.B.; Hirose, T.; Kawashima, E.H.; Itakura, K. (1981). Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**, 6613

Swanton, C.; Mann, D.J.; Fleckenstein, B; Neipel, F.; Peters, G.; Jones, N. (1997). Herpes viral cyclin D/cdk complexes evade inhibition by CDK inhibitor proteins. *Nature* **390**, 184

Takahashi, T.; Nau, M.M.; Chiba, I.; Birrer, M.J.; Rosenberg, R.K.; Vinocour, M.; Levitt, M.; Pass, H.; Gazdar, A.F.; Minna, J.D. (1989). p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* **246**, 491

Takahashi, T.; Carbone, D.; Takahashi, T.; Nau, M.M.; Hida, T.; Limmoila, I.; Veda, R.; Minna J.D. (1992). Wild-type but not mutant p53 suppresses the growth of human lung cancer cells bearing multiple genetic lesions. *Cancer Res* **52**, 2340

Tang, W.; Keesler, G.A.; Tabas, I. (1997). The structure of the gene for murine CTP: phosphocholine cytidylyl transferase, *Ctpct*. Relationship of exon structure to functional domains and identification of transcriptional start sites and potential upstream regulatory elements. *J Biol Chem* **272**, 13146

Thome, M.; Schneider, P.; Hofmann, K.; Fickenscher, H.; Meinl, E.; Neipel, F.; Mattmann, C.; Burns, K.; Bodmer, J.L.; Schroter, M.; Scaffidi, C.; Krammer, P.H.; Peter, M.E.; Tschopp, J. (1997). Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* **386**, 517

Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456

Thompson, M.P. and Kurzrock, R. (2004). Epstein-Barr Virus and Cancer. *Clin Cancer Res* **10**, 803

Tsang, S.X.; Morris, G.F.; Lu, M.; Morris, C.B. (1996). TATA-dependent repression of human immunodeficiency virus type-1 transcription by the adenovirus E1A 243R oncoprotein. *Oncogene* **12**, 819

Van Muijen, G.N.; Jansen, K.F.; Cornelissen, I.M.; Smeets, D.F.; Beck, J.L.; Ruiter, D.J. (1991). Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. *Int J Cancer* **48**, 85

Velcich, A and Ziff E. (1985). Adenovirus E1a proteins repress transcription from the SV40 early promoter. *Cell* **40**, 705

Verma, S.C.; Borah, S.; Robertson, E.S. (2004). Latency-Associated Nuclear Antigen of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Up-Regulates Transcription of Human Telomerase Reverse Transcriptase Promoter through Interaction with Transcription Factor Sp1. *J Virol* **78**, 10348

Villaret, D.; Glisson, B.; Kenady, D. ; Hanna, E. ; Carey, M. ; Gleich, L. ; Yoo, G.H.; Futran, N.; Hung, M.C.; Anklesaria, P.; Heald, A.E. (2002). A multicenter phase II study of tgDCC-E1A for the intratumoral treatment of patients with recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* **24**, 661

Wagener, C. (1999). *Viren In: Molekulare Onkologie Entstehung maligner Tumoren.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Wang, H.; Draetta G.; Moran E. (1991). E1A induces phosphorylation of the retinoblastoma protein independently of direct physical association between the E1A and retinoblastoma products. *Mol Cell Biol* **12**, 4353

Weintraub, H.; Davis, R.; Tapscott, S.; Thayer, M.; Krause, M.; Benezra, R.; Blackwell, T.K.; Turner, D.; Rupp, R.; Hollenberg, S., et al. (1991). The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* **251**, 761

Whitby, D.; Howard, M.; Tennes-Flowers, M.; Brink, N.; Copas, A.; Boshoff, C.; Hatzioannou, T.; Suggett, F.; Aldam, D.; Denton, A.; et al. (1995). Detection of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. *Lancet* **346**, 799

White, E.; Sabbatini, P.; Debbas, M.; Wold, W.S.; Kusher, D.I.; Gooding, L.R. (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

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

White E. (2001). Regulation of the cell cycle and apoptosis by the oncogenes of adenovirus. *Oncogene* **20**, 7836

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

Wilke, N.; Sganga, M.W.; Gayer, G.G.; Hsieh, K.P.; Miles, M.F. (2000). Characterization of promoter elements mediating ethanol regulation of hsc70 gene transcription. *J Pharmacol Exp Ther* **292**, 173

Wilson, K.E.; Li, Z.; Kara, M.; Gardner, K.L.; Roberts, D.D. (1999).  $\beta_1$ integrin- and proteoglycan-mediated stimulation of T lymphoma cell adhesion and mitogen-activated protein kinase signalling by thrombospondin-1 and thrombospondin-1 peptides. *J Immunol* **163**, 3621

Xu, Y.; Porntadavity, S.; St Clair, D.K. (2002). Transcriptional regulation of the human manganese superoxide dismutase gene: the role of specificity protein 1 (Sp1) and activating protein-2 (AP-2). *Biochem J* **362**, 401

Zender, L.; Kuhnel, F.; Kock, R.; Manns, M.; Kubicka, S. (2002). VP22-mediated intercellular transport of p53 in hepatoma cells in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther* **9**, 489

Zerler, B.; Moran, B.; Maruyama, K.; Moomaw, J.; Grodzicker, T.; Ruley, H.E. (1986). Adenovirus E1A coding sequences that enable ras and pmt oncogenes to transform cultured primary cells. *Mol Cell Biol* **6**, 887

Zhong, W.; Wang, H.; Herndier, B.; Ganem, D. (1996). Restricted expression of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genes in Kaposi sarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 6641

Zhou, Q. and Engel, D.A. (1995). Adenovirus E1A243 disrupts the ATF/CREB-YY1 complex at the mouse c-fos promoter. *J Virol* **69**, 7402

Zwicker J.; Lucibello F.C.; Wolfrain, L.A.; Gross, C.; Truss, M.; Engeland, K.; Mueller, R. (1995). Cell cycle regulation of the cyclin A, cdc25c and cdc2 genes is based on a common mechanism of transcriptional repression. *EMBO J* **14**, 4514

## **Anhang**

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Transkripte LT1 und LT2..	8
Abb. 2: mRNAs der hoch-onkogenen Ad12 E1As und der nicht-onkogenen Ad2 bzw. Ad5 E1As.....	12
Abb. 3: Darstellung der Interaktion des 289 Aminoreste (R) großen Proteins von Ad2/5 E1A mit zellulären Proteinen und seinen Funktionen.....	14
Abb. 4: Kompetitiv-semiquantitative PCR mit isoliertem KSHV und dem Kompetitorfragment als 1:10-Verdünnungen von 100 amol/μl bis 10 <sup>-6</sup> amol/μl.....	59
Abb. 5: Zweite kompetitive PCR mit isoliertem HHV-8-Virus und dem Kompetitorfragment als 1:2-Verdünnungen von 10 amol/μl bis 0,625 amol/μl.....	60
Abb. 6: Schematische Darstellung des LANAp und Promotorfragmente.....	62
Abb. 7: Schematische Darstellung des del -653-AP-2-Promotorfragmentes.....	64
Abb. 8: Klonierungsschema am Beispiel des del -653 -AP-2-Promotors.....	65
Abb. 9: Isolierung des del -653-Promotorfragmentes aus humaner Plazenta-DNA mittels PCR (A) und Analyse des del-653 -AP-2-Promotorfragments durch Verdau nach Klonierung in den pCR2.1-Topo-Vektor (B).....	66
Abb. 10: Identifizierung der Bakterienklone mit 653-bp Insert mit Hilfe von PCR. ...	67
Abb. 11: Analyse des pGL3-del-653 -AP-2-Promotors durch Verdau mit den Enzymen NheI und HindIII nach Mini-Präparation (A) und Kontrolle des klonierten pGL3-del-653 -AP-2-Promotorkonstrukts mittels Verdau mit den Restriktionsenzymen NheI und HindIII nach Maxi-Präparation.....	68
Abb. 12: Funktionskontrolle und Vergleich der Aktivität verschiedener LANAp-Konstrukte in unterschiedlichen Zelllinien. transfiziert.....	70
Abb. 13: Western-Blot-Analyse der Expression der E1A-Proteine.....	72
Abb. 14: Einfluss der Ad5 E1A-Proteine auf die Aktivität der verschiedenen Konstrukte des LANAp in HEK293-Zellen..	73
Abb. 15: Diagramm der wildtyp und der transformationsdefekten Ad12 und Ad2/5 E1A-Proteine.....	74
Abb. 16: Quencheffekt der Aktivität des LANAp in Abhängigkeit der transfizierten Menge von E1A-cDNA in MV3-Zellen..	75
Abb. 17: Einfluss der transfizierten Spm2-Mutante, der Ad12 und Ad2 13S und 12S auf die Aktivität des WT LANAp in MV3-Zellen..	76
Abb. 18: Effekt der Kotransfektion der Spm2-Mutante, Ad12 und Ad2 13S bzw. 12S und dem del -262-Promotors in MV3-Zellen.....	77
Abb. 19: Einfluss der Spm2-Mutante, der Ad12 und Ad2 sowohl 13S als auch 12S auf die Aktivität des del -67-Promotors (A), des del -59-Promotors (B) und des del -59-SP1-Promotors (C) von HHV-8 in MV3-Zellen..	79
Abb. 20: Einfluss von Ad5 13S, Ad5 E1A-Deletionsmutanten und der Spex auf die Aktivität des WT LANAp in der Melanomzelllinie MV3.....	81
Abb. 21: Einfluss der Spm2-Mutante, Ad12 E1A und Ad2 13S sowie 12S auf die Aktivität des del -653-AP-2-Promotors in MV3-Zellen.....	83
Abb. 22: Einfluss von E1A auf die Aktivität des <i>Hsp70</i> -Promotors in MV3-Zellen. ...	85
Abb. 23: Einfluss der Spm2-Mutante, der Ad12 E1A und Ad2 13S als auch 12S auf die Aktivität des hTERT-Promotors (Kirch et al., 2002) in MV3-Zellen. 86	

Abb. 24: Einfluss von E1A auf die Aktivität des SV40-Promotors in MV3-Zellen.....	88
Abb. 25: Einfluss der Ad2 13S und 12S auf die Aktivität des WT LANAp in der HHV-8-positiven B-Zelllinie BC-3.....	90
Abb. 26: Einfluss der Spm2-Mutante auf die Aktivität des WT LANAp (A) und Einfluss der Ad2 13S und 12S auf den del -262-HHV-8-Promotor (B) in der HHV-8-positiven B-Zelllinie BC-3.....	92
Abb. 27: Einfluss der Spm2-Mutante auf die Aktivität des Hsp70- (A) und des hTERT-Promotor (B) in der HHV-8-positiven B-Zelllinie BC-3.....	94
Abb. 28: Einfluss von Ad2 E1A auf die Aktivität des WT LANAp in der HHV-8-negativen B-Zelllinie RPMI8226.....	96
Abb. 29: Einfluss von LANA alleine und vCyclin, vFLIP und LANA zusammen auf die Aktivierung des WT LANAp durch die Spm2-Mutante in der Melanomzelllinie MV3.....	98
Abb. 30: Untersuchung des Überlebens der HHV-8-positiven B-Lymphozyten unter dem Einfluss von Ad12 E1A.....	100
Abb. 31: Einfluss der Spm2-Mutante auf das Überleben der HHV-8-positiven B-Lymphozyten.....	102
Abb. 32: Untersuchung der Resistenz der transient mit Ad12 E1A-cDNA transfizierten HHV-8-positiven B-Lymphozytenlinie BC-3 gegenüber der Cyclophosphamidbehandlung.....	104
Abb. 33: Untersuchung des Überlebens der transient mit der Spm2-Mutante transfizierten HHV-8-positiven B-Lymphozytenlinie BC-3 gegenüber der Cyclophosphamidbehandlung.....	106
Abb. 34: Darstellung der Unterschiede der LANAp's nach Sarid et al., 1999 und nach Jeong et al., 2004.....	116

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Liste der verwendeten Oligonukleotide.....	33
Tab. 2: Aufstellung der neu klonierten Konstrukte des LANAp.....	64
Tab. 3: Vergleichsübersicht der Basisaktivitäten des LANAp und seiner Promotorkonstrukte.. .....	111
Tab. 4: Übersicht über die Aktivierung der verschiedenen Konstrukte von LANAp durch unterschiedliche E1A-Konstrukt in MV-3-Zellen.. .....	119

## Publikationen

Stanelle J., Stiewe T., Rödicker F., Köhler K., Theseling C., Pützer B.M. (2003): Mechanism of E2F1-induced apoptosis in primary vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* 59: 512 – 519

Karin Koehler-Hansner, Ornella Flore, Bertram Opalka, Ulrich R. Hengge. N-terminal domains but not conserved region 3 of adenoviral E1A proteins are important for activation of the promoter of latent KSHV/HHV-8 genes. (in Revision)

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Karin Köhler-Hansner
Adresse	Rechenweg 4 42655 Solingen
Geburtsdatum	20.01.1973
Geburtsort	Trier
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand	verheiratet

### Schulbildung

07/1979 – 07/1983	Grundschule An der Neuwies, Trier-Irsch
08/1983 – 07/1989	Blandine-Merten-Realschule, Trier
08/1989 – 06/1993	Angela-Merici-Gymnasium, Trier
	Schulabschluss: Abitur

### Hochschulausbildung

10/1994 – 11/2001	Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
01/2001 – 11/2001	Diplomarbeit am Institut für Molekularbiologie, Universitätsklinikum Essen Abschlußnote: Gut Studienabschluss: Diplom-Biologin
seit 12/2001	Promotionsarbeit am Klinikum der Universität Duisburg-Essen, Innere Klinik/Tumorforschung, Arbeitsgruppe Prof. Hengge Universitätshautklinik Düsseldorf

### Berufliche Tätigkeiten

12/2001 – 09/2004	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Universitätsklinikum Essen, Innere Klinik/Tumorforschung, Arbeitsgruppe Prof. Hengge Universitätshautklinik Düsseldorf
seit 10/2004	Freiberufliche Tätigkeit als Klinische Monitorin für Novartis Pharma GmbH

### Auslandsaufenthalte

07/1993 – 08/1994	Aufenthalt als Au-Pair in den USA (Virginia)
11/1996 – 11/1997	Aufenthalt als Au-Pair in den USA (Virginia)
01/1998 – 07/1998	USA-Aufenthalt: Rundreise
06/2002 – 08/2002	Forschungsaufenthalt in den USA an der New York University Medical School, Department of Microbiology

## Erklärungen

Erklärung:

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 „E1A als potentiell Gentherapeutikum HHV-8-positiver Tumore: Evaluation mit HHV-8-Promotorelementen in HHV-8-positiven und –negativen Zellen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Karin Köhler-Hansner befürworte.

Essen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(Prof. Dr. B. Opalka)

Erklärung:

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 \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(Karin Köhler-Hansner)

Erklärung:

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 \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(Karin Köhler-Hansner)